Zeitschrift für Vererbungslehre 92, 63—68 (1961)

Aus dem Zoologischen Institut Bonn

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AUSBREITUNG DER MELANOBLASTEN BEI EINFARBIG SCHWARZEN RATTEN UND BEI HAUBENRATTEN

Von

GERTRUD WENDT-WAGENER

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. März 1961)

Der Rumpf der *schwarz-weißen Haubenratte* (Abb. 1) bleibt, wie ich in der vorangegangenen Mitteilung (WAGENER 1959) zeigen konnte, deshalb weiß, weil sich hier die Haut zur Zeit des Eintreffens der Melanoblasten schon soweit differenziert hat, daß die vom Kopf her zuwandernden Pigmentzellen nicht in die Rumpfregion vordringen können. Die seinerzeit offengebliebene Frage, ob das Gen h, das für die Scheckung der Haubenratte verantwortlich ist, die Melanoblastenwanderung verlangsamt oder den Ablauf der Hautdifferenzierung beeinflußt, kann ich jetzt auch beantworten. Die Entscheidung ergab sich aus vergleichenden Untersuchungen über die Melanoblastenwanderung und die Hautentwicklung bei Embryonen von gescheckten und einfarbig schwarzen Ratten.

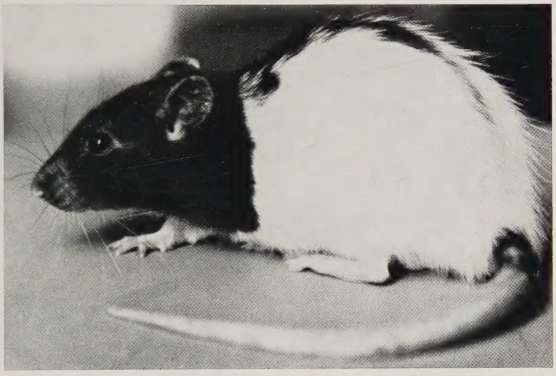


Abb. 1. Haubenratte

Material und Methoden

Den Beobachtungen liegen Schnittpräparate durch die Haut 14—23tägiger Embryonen zugrunde. Die Tragzeit dauert bei beiden Rassen gleich lange, nämlich 23 Tage. Den Zeitpunkt der Ovulation und damit das Alter der Embryonen kann man nach der Scheidenabstrichmethode von LONG und EVANS (1922) genau festlegen. Da sich die jungen noch nicht pigmentierten Melanoblasten von den übrigen Körperzellen bekanntlich nicht unterscheiden lassen, regte ich sie künstlich zur Pigmentbildung an, und zwar mit Röntgenstrahlen (MENG 1956, WENDT 1959). Die Dosis betrug 1200—1500 r. Bei diesen Versuchen öffnete ich die Bauchdecke des trächtigen Weibchens und bestrahlte dann die Embryonen im Uterus nach Abdeckung des Muttertieres mit Bleiplatten. Einen Tag nach der Bestrahlung entnahm ich die Embryonen, fixierte die Haut nach BOUIN und versilberte die Schnitte nach MASSON. Den Differenzierungszustand der Haut erkennt man am besten nach Azan-Färbung.

Die Differenzierung der Haut und der Haare

Die Differenzierung der Haut und der Haare (DANNEEL 1931) verläuft bei der Haubenratte genauso wie bei der einfarbig schwarzen Ratte.

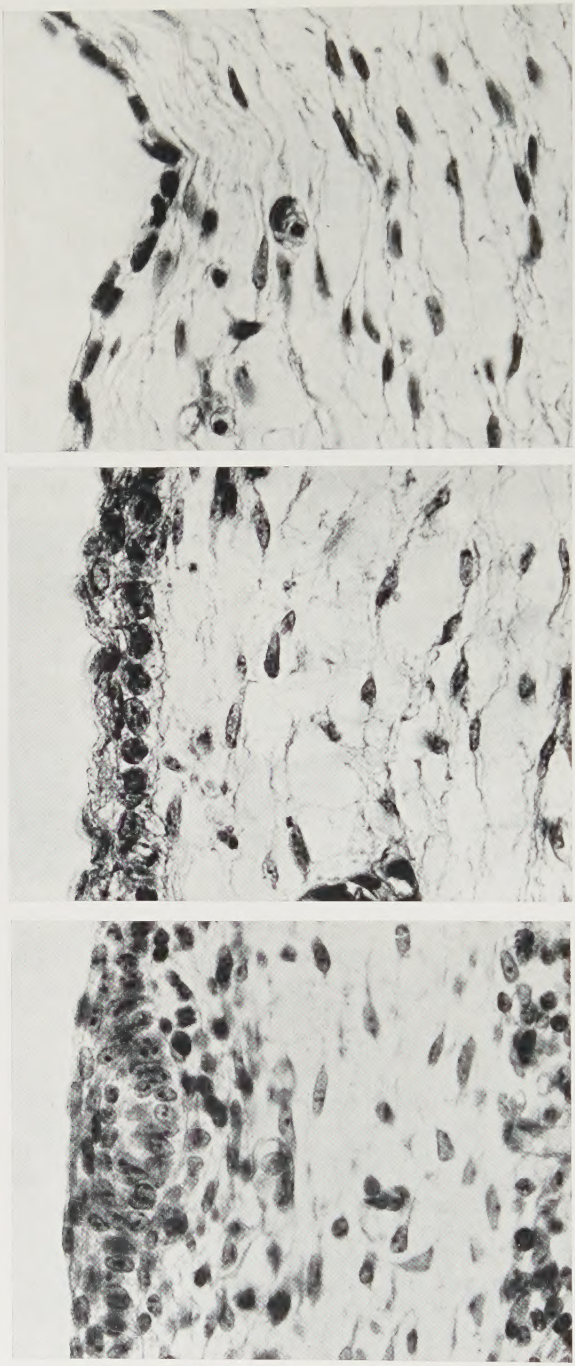


Abb. 2a—c. Schnitte durch die Haut eines 16—17 Tage alten Embryos der einfarbig schwarzen Ratte (Vergr. 300mal). a) Epidermis der Flanke. Dreischichtig mit Leithaaranlage. Beginnende Muskelbildung unterhalb der Cutis. b) Epidermis des Rückens. Zweischichtig. Cutis noch undifferenziert. c) Epidermis des Kopfes. Einschichtig. Cutis noch undifferenziert

Beim *14tägigen Embryo* treten erste Epidermiseinsenkungen an der Schnauze auf. Es handelt sich um die Anlagen der späteren *Barthaare*, die oberhalb der Mundwinkel erscheinen. Diese zuerst angelegten Haarkeime bilden später die stärksten und längsten Tasthaare.

Die *ersten Leithaare* erscheinen beim *16tägigen Embryo an den Flanken* und zwar in der ganzen Längsausdehnung des Tieres (Abb. 2a). Sie entstehen vor den Grannenhaaren und lange vor den Wollhaaren; auch am Körper entwickeln sich also die stärksten Haare zuerst. Am Kopf, auf dem Rücken und auf der Bauchseite sind zu dieser Zeit überhaupt noch keine Haaranlagen vorhanden. Auch die *Epidermis* ist hier erst schwach entwickelt und besitzt nur 1—2 Zellagen (vgl. Abb. 2a mit b und c). Die *Cutis* hat sich beim 16tägigen Embryo noch nirgends in Lederhaut und Unterhautbindegewebe differenziert, besteht aber an den Flanken aus dichterem Bindegewebe, in dessen unterem Teil auch bereits die ersten Muskelfasern erkennbar sind

(Abb. 2a). Unter den jungen Haarkeimen der Flanke sammeln sich mancherorts schon die Bindegewebszellen an, die später die Haarpapille bilden.

Die ersten Haaranlagen entstehen also dort, wo die Haut am weitesten ausgebildet ist, und man kann daher das Entwicklungsstadium der Leithaare als Maß für die Hautdifferenzierung verwenden.

Von den Flanken ausgehend, greift die Leithaarbildung am *17. und 18. Tage* auf den Rücken über. Zu dieser Zeit sind die Leithaare an den Flanken schon recht weit entwickelt und in ihrer Umgebung erscheinen bereits die ersten Anlagen von Grannenhaaren. Beim 18—19tägigen Embryo beginnt schließlich auch die Haarentwicklung am Bauch und auf dem Kopf. An diesen beiden Körperstellen unterscheiden sich die einzelnen Haartypen aber nur sehr wenig voneinander.

Die *Epidermis* der Flanke setzt sich beim 19tägigen Embryo schon aus den bekannten vier Schichten zusammen, während die Rücken- und Kopfepidermis noch immer kein klar erkennbares Stratum corneum aufweist. Auch die *Cutis* ist an den Flanken am weitesten entwickelt und hier bereits in Leder- und Unterhautbindegewebe differenziert. Dasselbe gilt für die Cutis der Rückenhaut, wohingegen die Kopfhaut immer noch aus lockerem, kaum differenziertem Bindegewebe besteht.

Die ersten Wollhaare erscheinen beim *22—23tägigen Embryo* und zwar auch wieder an den Flanken und anschließend auf dem Rücken. Am Kopf und am Bauch entstehen die Leit-, Grannen- und Wollhaare fast gleichzeitig und zwar 3—5 Tage später als in der Flankenregion.

Beim *23tägigen Embryo* ist die Epidermis am ganzen Körper voll ausgebildet. Die Cutis der Kopfhaut besitzt aber auch jetzt noch keine Muskelschicht, während man am Rücken und an der Flanke neben der Längsmuskulatur schon die ersten querverlaufenden Muskelstränge sieht. Bei der *Geburt* der jungen Tiere ist dann die Differenzierung der Haut und der Haare am ganzen Körper abgeschlossen.

Abb. 3 gibt den Gesamtablauf noch einmal schematisiert wieder. Die Zeitangaben beziehen sich hier aber auf die Verdichtung des Bindegewebes, die überall etwa 2 Tage nach dem Erscheinen der ersten Leithaaranlagen einsetzt und für die Melanoblastenwanderung (s. u.) besonders wichtig ist.

Die Melanoblasteneinwanderung in die Haut

Während die Differenzierung der Haut bei den Haubenratten und den einfarbig schwarzen Tieren, wie gesagt, gleich verläuft (Abb. 3), ergab die Untersuchung der Melanoblastenwanderung bei den beiden Rassen deutliche zeitliche Unterschiede.

a) Die einfarbige schwarze Ratte. Bei der einfarbig schwarzen Ratte (Abb. 4a) treten die ersten histologisch nachweisbaren *Melanoblasten am 15. Embryonaltage* im subcutanen Bindegewebe der Kopfhaut auf. Diese Pigmentzellen wandern dann später durch die Cutis in die Epidermis ein und gelangen so in die Haarwurzeln (s. Schumann 1960, Fig. 7 und 8).

Die Pigmentzellen, die am 17. Embryonaltage vom Kopf aus zunächst die Rückenhaut besiedeln, dringen dann im Laufe des 18. und 19. Embryonaltages über die Flanken ventralwärts vor und erscheinen etwa am 20. Tage in der Bauchregion. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit läßt zuletzt stark nach; selbst am

23. Embryonaltage trifft man daher in der ventralen Mittellinie erst vereinzelte Melanoblasten an. Inzwischen haben die Melanoblasten am ganzen Körper die Cutis verlassen. Ein Teil von ihnen dringt, wie gesagt, in die Haarwurzeln ein; alle übrigen bleiben in der Epidermis liegen, stellen die Pigmentbildung ein und ziehen ihre Ausläufer ein. Durch geeignete Reize, wie Röntgenstrahlen, lassen sich diese Melanoblasten aber vorübergehend reaktivieren.

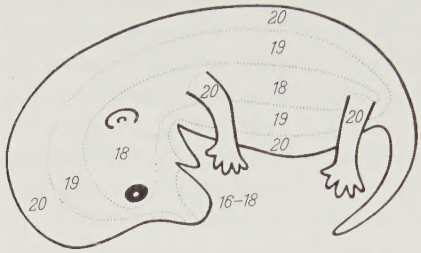


Abb. 3. Der zeitliche und räumliche Verlauf der Hautdifferenzierung. Die Ziffern geben das Embryonalalter in Tagen wieder und beziehen sich auf die Verdichtung der Cutis, die 2 Tage nach dem Erscheinen der ersten Leithaar-Anlagen einsetzt

Da die wanderungshemmende Differenzierung und Verdichtung des Bindegewebes in die Zeit vom 18.—20. Embryonaltage fällt (Abb. 3), haben die Melanoblasten der einfarbig schwarzen Ratten, wie aus Abb. 4a hervorgeht, ausreichend Zeit, sämtliche Regionen des Körpers zu besiedeln.

b) Die Haubenratte. Die ersten, im histologischen Schnitt durch Versilberung nachweisbaren Melanoblasten erscheinen bei der Haubenratte am 16. Embryonaltage in der Kopfhaut, d. h. *einen Tag später* als bei der einfarbig schwarzen Ratte. Sie wandern dann ebenfalls rumpfwärts und stirnwärts weiter, aber, wie Abb. 4b zeigt, bedeutend langsamer, und *erreichen daher die Scheckungsgrenze* (Abb. 1) erst am 19. und 20. Tage, d. h. *mit nun schon zweitägiger Verspätung*. Hier hat

Abb. 4a u. b. Die Ausbreitung der Melanoblasten (Ziffern = Embryonaltage) a) bei einfarbig schwarzen Ratten, b) bei Haubenratten

sich aber inzwischen das Bindegewebe, wie ein Vergleich mit Abb. 3 lehrt, schon so stark verdichtet, daß die Melanoblasten nicht weiterwandern können. Den am weitesten vorgedrungenen Pigmentzellen gelingt nicht einmal mehr der Durchbruch aus der Subcutis in die Epidermis. Am äußersten Rande der Scheckungsgrenzen stehen daher bei der neugeborenen Haubenratte, so wie dies schon MENG (1955, Abb. 16) bei Meerschweinchen beobachtet hat, *weiße Haare auf pigmentierter Unterhaut*. Ein kleines Stück weiter rumpfwärts ist dann aber auch das Bindegewebe frei von Melanocyten.

Die einzige Stelle, an der die Pigmentzellen noch etwas weiter vordringen können, ist, wie ein Vergleich der Zeitangaben in den Abb. 3 und 4b lehrt, die Rückenmitte, also die Region des späteren *schwarzen Alstrichs* (Abb. 1), dessen Entstehung somit durchaus verständlich ist.

Ungeklärt bleibt jetzt nur noch die Bildung des schwarzen Flecks oberhalb der Schwanzwurzel der Haubenratte. Nach den Befunden Lubnows (1957) am Seidenhuhn darf aber als sicher gelten, daß an dieser Stelle auch bei den Ratten ein zweites funktionstüchtiges Entstehungszentrum für Melanoblasten liegt. Auf das damit zusammenhängende weitere Problem, warum die Neuralleiste in der zwischen den beiden Zentren liegenden mittleren Region des Körpers in vivo keine Melanoblasten produziert, obwohl sie in vitro dazu imstande ist (Rawles 1947; Koecke 1960), kann ich in diesem Zusammenhang nur hinweisen, weil hierzu noch keine experimentellen Untersuchungen vorliegen.

Zusammenfassung

Die Scheckung der schwarzen Haubenratte kommt durch die Interferenz zweier Entwicklungsvorgänge zustande, der Haut- und Haardifferenzierung einerseits und der Melanoblasteneinwanderung andererseits (Wagener 1959).

Die *Differenzierung der Haut und der Haare* verläuft bei der Haubenratte genauso wie bei der einfarbig schwarzen Ratte. Sie beginnt an den Flanken und greift von dort aus allmählich auf den Rücken, den Bauch und den Kopf über (Abb. 3).

Auch hinsichtlich der *räumlichen Ausbreitung der Melanoblasten* bestehen bei den beiden Rassen keine Differenzen. Hier wie dort wandern die aus der Neuralleiste des Kopfes stammenden Pigmentzellen in der Subcutis caudal- bzw. ventralwärts ab und besiedeln zunächst den Rücken (Abb. 3).

Der entscheidende Unterschied zwischen der Haubenratte und der einfarbig schwarzen Ratte besteht vielmehr in der *Geschwindigkeit, mit der sich die Melanoblasten ausbreiten.* Bei der einfarbig schwarzen Rasse treten nämlich die ersten histologisch nachweisbaren Melanoblasten schon am 15. Embryonaltage auf (Abb. 4a), bei der Haubenratte erst einen Tag später, nämlich am 16. Embryonaltage. Diese Verspätung nimmt dann weiter zu und beträgt bei der Ankunft der Melanoblasten an der späteren Scheckungsgrenze (Abb. 4b) bereits 2 Tage. In der Zwischenzeit hat sich aber das Bindegewebe der Haut an dieser Stelle schon so weit verdichtet (Abb. 3), daß die Melanoblasten bei der Haubenratte nicht weiter vordringen können. Die dahinterliegende Rumpfpartie bleibt also weiß. Bei der einfarbigen Ratte tritt diese Kollision zwischen der Melanoblastenwanderung und der Hautdifferenzierung nicht ein, weil die Pigmentzellen hier alle Teile des Körpers rechtzeitig erreichen.

Der *Erbfaktor h*, auf dem die Haubenscheckung der Ratte beruht, *verlangsamt also nur die Melanoblastenwanderung.* Alles weitere ist die Folge der nunmehr gestörten Abstimmung zwischen der Ausbreitung der Pigmentzellen und dem Verlauf der Hautdifferenzierung, die durch das Gen h nicht beeinflußt wird. Auf gleiche Weise entsteht der weiße Stirnfleck der Blessenmäuse (Schumann 1960; Danneel u. Schumann 1961).

Literatur

Danneel, R.: Die Entwicklung der Haare bei der Ratte. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **4**, 733 (1931).

—, u. H. Schumann: Über die Entstehung und Vererbung der Blesse bei Mäusen. Z. Vererb.-Lehre **92**, 69 (1961).

Koecke, H. U.: Die Differenzierung der Melanoblasten zu Melanocyten und die Bildung des Melanins in vivo beim Entenembryo. Z. Zellforsch. **50**, 238 (1959).

Long, J. A., and McLean Evans: The oestrous cycle in the rat. Mem. University California **6**, 1 (1922).

Lubnow, E.: Die Pigmentierung des japanischen Seidenhuhnes. Biol. Zbl. **76**, 316 (1957).

Meng, M.: Das Verhalten der Pigmentzellen gescheckter Meerschweinchen während der Ontogenie und bei Regenerations- und Transplantationsversuchen. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **148**, 92 (1955).

Rawles, M. E.: Origin of the pigment cells from the neural crest in the mouse embryo. Physiol. Zool. **20**, 248 (1947).

Schumann, H.: Die Entstehung der Scheckung bei Mäusen mit weißer Blesse. Developm. Biol. **2**, 501 (1960).

Wagener, G.: Die Entstehung der Scheckung bei der schwarzen Haubenratte. Biol. Zbl. **78**, 451 (1959).

Wendt, E.: Das Verhalten der Melanoblasten verschiedener Hühnerrassen (Seidenhuhn und Leghorn) in Gewebekulturen. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **150**, 495 (1958).

Frau Dr. Gertrud Wendt-Wagener,
Zoologisches Institut der Universität,
Bonn a. Rh., Poppelsdorfer Schloß

Zeitschrift für Vererbungslehre 92, 69—73 (1961)

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Bonn

ÜBER DIE ENTSTEHUNG UND VERERBUNG DER BLESSE BEI MÄUSEN

Von

Rolf Danneel und Helga Schumann

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. März 1961)

Untersuchungen von Wagener (1959) an Haubenratten und von Schumann (1960) an Blessenmäusen haben gezeigt, daß die Scheckung in diesen beiden Fällen durch eine genetisch bedingte Verzögerung der Melanoblastenwanderung zustande kommt. Die Folge hiervon ist, daß die verspätet eintreffenden Pigmentzellen diejenigen Fellregionen nicht mehr besiedeln können, in denen sie zuletzt ankommen, weil sich dort die Haut inzwischen schon so weit differenziert hat, daß sie für die Melanoblasten unpassierbar geworden ist. Diese Stellen bleiben daher weiß.

Die Blesse (weißer Stirnfleck = white face) der Mäuse, von der hier weiterhin die Rede ist, beruht auf der Wirkung eines rezessiven Scheckungsfaktors s (Lit. bei Grüneberg 1952) und ist hinsichtlich ihrer Gestalt und Größe sehr variabel, eine Erscheinung, die nach Dunn u. Charles (1937) sowie anderen Autoren auf dem Einfluß von Modifikationsgenen beruht.

Die vorliegende Arbeit liefert dazu einen Beitrag, wobei uns vor allem die Frage interessierte, ob die s-bedingte Blesse durch etwa vorhandene Modifikationsgene vergrößert oder verkleinert wird.

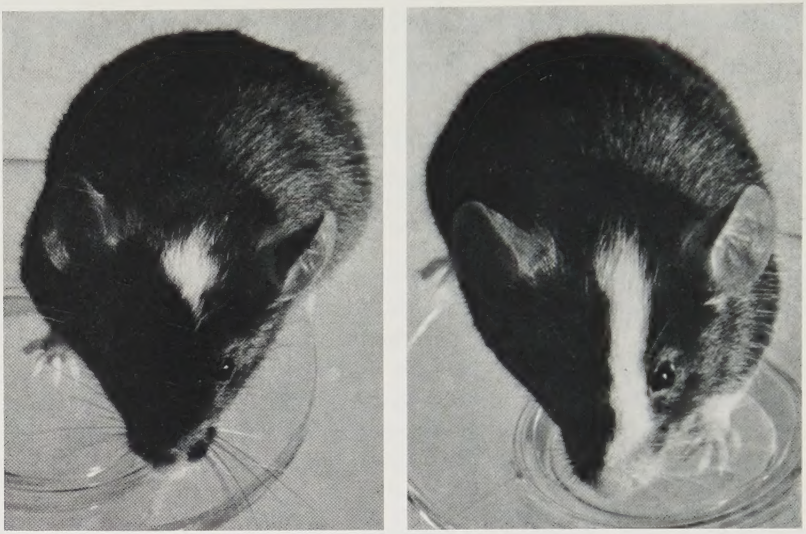
Die Vererbung der Blesse

Als Ausgangsrasse verwendeten wir den schon früher beschriebenen Schwarzloh-Stamm a^ts (Schumann 1960). Diese „black-and-tan"-Mäuse mit weißer Blesse haben ein schwarzes Rückenfell, das über einen lohfarbigen Flankenstreifen in die weißliche Behaarung des Bauches übergeht. Die Blesse selbst variiert bei unseren Tieren zwischen einem kleinen weißen Stirnfleck und einem breiten weißen Streifen, der bis zur Nasenspitze reicht (Abb. 1a und b).

Diese Blessenmäuse kreuzten wir mit einfarbig schwarzen Tieren (aS). Dabei fielen in der F_1-Generation ausschließlich Schwarzloh-Mäuse ohne Blesse (a^taSs); a^t dominiert also über a und S über s. Die weitere Kreuzung lieferte dann in der F_2 erwartungsgemäß vier verschiedene Phänotypen (Tabelle 1).

Wie zunächst ein Vergleich der gefundenen mit den errechneten Werten zeigt, traten viel zu wenige as-Tiere auf, nämlich nur 4 statt 23. Diese Abweichung ist statistisch hoch gesichert und zeigt, daß die Kombination des Scheckungsfaktors s mit dem Gen a eine starke *Herabsetzung der Vitalität* zur Folge haben kann.

Interessanter war uns der weitere Befund, daß die vier as-Mäuse außer der weißen Blesse noch *einen zweiten weißen Fleck am Bauch* besaßen (Abb. 2), der sich von den Vorderbeinen aus mehr oder weniger weit nach hinten erstreckte. Dieser Fleck, der auch bei unseren a^ts-Tieren vorhanden ist, war uns dort ent-



a b

Abb. 1a u. b. Zwei a^ts-Mäuse mit verschieden großer Blesse

gangen, weil diese Mäuse ohnehin einen weißlichen Bauch besitzen. Nachträglich stellten wir jedoch fest, daß man die Weiß-in-Weiß-Scheckung bei günstiger Beleuchtung auch hier deutlich erkennen kann. Die weißlichen Bauchhaare der a^tS-Mäuse sind nämlich an der Basis pigmentiert, während in der Scheckungszone rein weiße Haare stehen.

Tabelle 1. *F_2-Generation aus der Kreuzung $a^ta^tss \times aaSS$*

Phänotyp	Gefundene Anzahl	Theoretische Anzahl $\pm m$ (9:3:3:1)
Black-and-tan ohne Scheckung (a^tS)	228	$209 \pm 9{,}5$
Black-and-tan mit Scheckung (a^ts)	61	$69 \pm 7{,}5$
Schwarz ohne Scheckung (aS) . . .	77	$69 \pm 7{,}5$
Schwarz mit Scheckung (as)	4	$23 \pm 4{,}65$
Gesamtzahl der F_2-Tiere	370	370

Die Tatsache, daß dieser zweite Fleck gerade zwischen den Vorderbeinen auftritt, bestätigt im übrigen unsere Vorstellungen über die Entstehung der Scheckung. Diese Körperregion wird nämlich, wie ein Blick auf Abb. 3 lehrt, von den Melanoblasten ebenfalls besonders spät erreicht und zwar am 18. Tage, d. h. zu einer Zeit, wo die Bauchhaut etwa ebensoweit differenziert ist, wie die Stirnhaut am 16. Tage (SCHUMANN 1960).

Die weiterhin vorgenommenen *Rückkreuzungen* der F_1-Bastarde mit ihren gescheckten Eltern lieferten in 20 Würfen 113 Nachkommen und zwar bei einer Erwartung von $56{,}5 \pm 5{,}3$:

64 black-and-tan-Tiere *ohne* Scheckung (a^tS),

49 black-and-tan-Tiere *mit* Scheckung (a^ts).

Ebenso wie schon bei den Ausgangsversuchen (Tabelle 1, Zeile 1 und 2) sind auch hier die gescheckten a^ts-Tiere den einfarbigen gegenüber benachteiligt, doch ist die statistische Sicherung in diesem Falle nicht so gut wie bei den früher erwähnten as-Mäusen.

Abb. 2. Schwarze Blessenmaus (as) mit weißem Bauchstreifen

Die Variabilität der Blesse

Die Größe der s-bedingten weißen Blesse variiert, wie gesagt, bei den einzelnen Individuen erheblich. Um Näheres hierüber zu erfahren, haben wir aus unserem black-and-tan-Stamm einzelne Tiere mit besonders kleiner Blesse und solche mit großer Blesse (Abb. 1a und b) ausgelesen und getrennt durch Geschwisterkreuzung vermehrt. Den weißen Bauchfleck haben wir dabei außer acht gelassen, weil er bei den weißbäuchigen a^t-Tieren zu schlecht zu erkennen war.

Der Versuch, einen *Stamm mit kleinem weißem Stirnfleck* zu züchten, schlug fehl. Die Blesse wies nämlich bei der 6. Inzuchtgeneration noch immer dieselbe Variationsbreite auf wie bei den Ausgangstieren. Hier wie dort überwogen die Tiere mit großer Blesse, und dasselbe gilt auch für alle Zwischengenerationen.

Anders verlief die *Selektion auf große Blesse*. Hier traten schon in den ersten Generationen kaum mehr Tiere mit kleinem Stirnfleck auf, bis schließlich in der 6. Generation überhaupt nur noch Nachkommen mit großer Blesse anfielen (Tabelle 2). Eine Selektion auf große Blesse (Abb. 1b) ist also möglich.

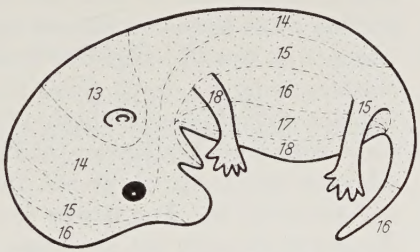


Abb. 3. Schematische Darstellung der Melanoblastenwanderung bei Embryonen von einfarbig schwarzen Mäusen. Die Zahlen geben das Embryonalalter in Tagen an

Wir schließen aus diesen Befunden erstens, daß die Ausdehnung des weißen Kopfflecks wirklich durch Modifikationsgene beeinflußt wird, und zweitens, daß eine Anhäufung dieser Gene zu einer Verkleinerung der ursprünglich großen, s-bedingten Blesse führt, da eine Selektion im Laufe weniger Generationen natürlich nur dann Erfolg haben kann, wenn von vorneherein keine oder nur wenige Modifikationsgene vorhanden waren.

Die erfolglose Zucht auf kleine Blesse haben wir nach der 6. Generation abgebrochen. Bei den Tieren mit großer Blesse wurden die Würfe im Laufe der Zeit immer kleiner. In der 7. Generation fielen durchschnittlich nur noch vier

Junge je Wurf, in der 8. Generation drei und in der 9. Generation überhaupt keine mehr (Tabelle 2).

Bei unserem black-and-tan-Stamm führt die fortgesetzte Auslese auf große Blesse also zu Sterilität oder zu einem vorzeitigen Absterben der Embryonen; ob dies auch für andere „white-face"-Stämme zutrifft, muß allerdings abgewartet werden.

Tabelle 2. *Abnahme der Wurfgröße bei Selektion auf große Blesse*

	Anzahl der Elternpaare	Anzahl der Nachkommen	Durchschnittliche Wurfgröße
1. Gen.	4	28	7,0
2. Gen.	6	39	6,3
3. Gen.	8	51	6,3
4. Gen.	8	51	6,3
5. Gen.	8	48	6,0
6. Gen.	8	43	5,4
7. Gen.	8	31	3,9
8. Gen.	5	15	3,0
9. Gen.	5	—	—

Diskussion der Ergebnisse

Über die Entstehung der vielen verschiedenen Farbmuster bei Säugetieren konnte man sich bis etwa zum Jahre 1935 kein zutreffendes Bild machen, weil man bis dahin glaubte, das Pigment der Haut und der Haare entstände an Ort und Stelle, d. h. in modifizierten Epidermis- oder Cutiszellen. Inzwischen hat sich aber bekanntlich herausgestellt, daß die Melanine in besonderen Zellen — den Melanoblasten — synthetisiert werden, die aus der embryonalen Neuralleiste stammen und von dort aus durch das subepidermale Gewebe an ihren Bestimmungsort wandern. Damit ergaben sich für die Pigmentforschung neue Überlegungen und experimentelle Möglichkeiten, da man es nun ja mit Bewegungsvorgängen zu tun hatte, die für Genwirkungen mancherlei Angriffspunkte bieten.

Die beiden Farbmuster, deren Entstehung wir in der letzten Zeit untersucht haben, die Haubenscheckung der Ratte (Wagener 1960, Wendt-Wagener 1961) und die weiße Blesse bei Mäusen (Schumann 1960, Danneel u. Schumann 1961) kommen im Prinzip auf gleiche Weise zustande. In beiden Fällen wird die Melanoblastenwanderung durch Genwirkung verzögert. Die Folge davon ist, daß die nunmehr verspätet eintreffenden Pigmentzellen bestimmte Teile des Integuments nicht mehr besiedeln können, nämlich solche, wo die Haut infolge der inzwischen schon zu weit fortgeschrittenen Differenzierung für die Melanoblasten unpassierbar geworden ist. Der Beweis hierfür konnte sowohl bei der Haubenscheckung der Ratte als auch bei der Blesse der Mäuse durch vergleichende histologische Untersuchungen über den Verlauf der Hautdifferenzierung und der Melanoblastenwanderung erbracht werden. Im Einklang mit Goldschmidts Theorie der Genwirkung wird also hier ein Teilvorgang der Entwicklung — nämlich die Melanoblastenwanderung — unter dem Einfluß des mutierten Erbfaktors zeitlich verschoben, kollidiert infolgedessen mit einem anderen, unverändert gebliebenen Ablauf — der Hautdifferenzierung — und führt so zu einem neuen Phänotyp.

Der hier geschilderte spezielle Fall darf aber sicher nicht verallgemeinert werden. Aus noch unveröffentlichten Untersuchungen von Danneel, Schumann und Coenen geht nämlich schon hervor, daß beim Lakenfelder Huhn andere Verhältnisse vorliegen. Auch die Entstehung der weit verbreiteten Flecken- und Streifenmuster verläuft sicher anders als die Musterbildung bei den von uns untersuchten Nagern.

Die eingangs erwähnten Fortschritte der Pigmentforschung haben auch noch in anderer Hinsicht zu einer Revision eingebürgerter Vorstellungen geführt. Da wir nämlich jetzt sicher wissen, daß das Pigment der Wirbeltiere von besonderen Zellen eigens synthetisiert wird, läßt sich die alte Hypothese nicht mehr halten, wonach die Melanine lediglich Abfallprodukte des Stoffwechsels seien und vom Organismus in die peripheren Gewebe abgeschoben würden, um dann beim Haarwechsel oder bei der Hauterneuerung endgültig beseitigt zu werden.

Zusammenfassung

1. Die Blesse variiert bei den „white-face"-Mäusen zwischen einem kleinen weißen Stirnfleck und einem breiten Streifen, der sich von der Stirn über den ganzen Nasenrücken erstreckt.

2. Eine Selektion auf kleine Blesse gelang uns nicht, wohl aber die Isolierung eines Stammes mit großer Blesse. Die Blesse kann also durch Modifikationsgene verkleinert, nicht aber vergrößert werden.

3. Bei unseren Blessenmäusen trat ein zusätzlicher weißer Fleck zwischen den Vorderbeinen auf, d. h. an derjenigen Stelle, die nach unseren früheren Untersuchungen über den Verlauf der Hautdifferenzierung und der Melanoblastenwanderung dazu prädestiniert ist.

Literatur

Dunn, L. C., and D. R. Charles: Studies of spotting patterns. Genetics **22**, 14—42 (1937).

Goldschmidt, R.: Physiological genetics. New York: Mac Graw-Hill Book Comp. 1938.

Grüneberg, H.: The genetics of the mouse. The Hague: Martinus Nijhoff 1952.

Schumann, H.: Die Entstehung der Scheckung bei Mäusen mit weißer Blesse. Developm. Biol. **2**, 501—515 (1960).

Wagener, G.: Die Entstehung der Scheckung bei der Haubenratte. Biol. Zbl. **78**, 451—460 (1959).

Wendt-Wagener, G.: Untersuchungen über die Ausbreitung der Melanoblasten bei einfarbig schwarzen Ratten und bei Haubenratten. Vererb.-Lehre **92**, 63 (1961).

Dr. Rolf Danneel,
Zoologisches Institut der Universität,
Bonn, Poppelsdorfer Schloß

Zeitschrift für Vererbungslehre 92, 74—84 (1961)

Aus dem Institut für allgemeine Biologie der Universität Wien

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN CHROMOSOMALEN POLYMORPHISMUS EINER POPULATION VON *DROSOPHILA SUBOBSCURA* AUF DEN LIPARISCHEN INSELN

Von

DIETHER SPERLICH

(Eingegangen am 1. Februar 1961)

Quantitative Standortanalysen über den chromosomalen Polymorphismus von *Drosophila subobscura* liegen aus der Schweiz, Frankreich, Portugal (STUMM-ZOLLINGER 1953), Israel (GOLDSCHMIDT 1956, 1958; STUMM-ZOLLINGER und GOLDSCHMIDT 1959) und Österreich (KUNZE-MÜHL, MÜLLER und SPERLICH 1958) vor. Die folgende Arbeit soll die bisherigen Analysen ergänzen, außerdem aber auch die Frage der Wirkungen der insulären Isolation behandeln. Aus diesem Grund wurden als Untersuchungsgebiet die Liparischen Inseln gewählt, die von den früher untersuchten Gebieten annähernd gleich weit entfernt sind.

Die Beschreibung einer strukturpolymorphen Population kann nach verschiedenen Methoden erfolgen. Die eine, die sich auf die Analyse von je einem Nachkommen je eines Wildweibchens beschränkt, wurde von STUMM-ZOLLINGER (1953) und GOLDSCHMIDT (1956) angewandt. Dabei können Aussagen über die Häufigkeit heterozygoter Inversionen gemacht werden, während eine Angabe über die homozygoten Strukturtypen und über die Strukturtypenhäufigkeit nicht möglich ist. Eine Analyse der homozygoten Inversionen ist infolge der zahlreichen übergreifenden und komplexen Inversionen bei *D. subobscura* äußerst mühsam und für statistische Untersuchungen nicht durchführbar. Ein anderer Weg ist die Analyse mehrerer Nachkommen je eines Wildmännchens, das mit einem Weibchen von bekannter homozygoter Struktur gekreuzt worden ist. Eine solche Analyse, die wohl weitaus mühsamer ist, erlaubt nicht nur Aussagen über die Häufigkeit heterozygoter Inversionen in der Natur, sondern auch über den Aufbau und die Häufigkeit der natürlichen Strukturtypen und wurde vor allem von KUNZE-MÜHL, MÜLLER und SPERLICH (1958) durchgeführt. Bei der Untersuchung der Inselpopulation von Lipari wurden beide Methoden angewandt. Es wurden die Männchen durch Einkreuzung mit dem Standardstamm „Küsnacht" analysiert und von den Nachkommen der Weibchen, die bereits in der Natur begattet worden waren, mehrere F_1-Larven präpariert. Dadurch konnte eine relativ vollständige Analyse der Population erzielt werden.

Fangorte und Methoden

Die Liparischen Inseln liegen im Tyrrhenischen Meer nördlich von Sizilien und sind vulkanischen Ursprungs. Die Hauptinsel Lipari liegt ungefähr 35 km vom nächsten Küstenpunkt entfernt und umfaßt 37,6 km². Die Entfernung von 35 km kann von *D. subobscura* auch bei günstigem Wind bestimmt nicht fliegend bewältigt werden. Lipari ist von den Inseln Vulcano und Salina nur durch schmale Meeresstraßen getrennt. Die Inseln Panarea, Stromboli, Filicudi und Alicudi sind sowohl von Lipari als auch untereinander weiter entfernt. Zwischen den einzelnen Inseln und Sizilien besteht ein regelmäßiger Schiffsverkehr, wobei zeitweise auch

Obsttransporte erfolgen. Es wäre denkbar, daß mit diesen einzelne Individuen von *Drosophila* verschleppt werden. Eine wesentliche Änderung in der Zusammensetzung der Inselpopulation ist dadurch jedoch kaum zu erwarten. In der Vegetation weichen die einzelnen Inseln stark voneinander ab. Auf Lipari, Salina und Panarea sind relativ viele Wein- und Obstgärten. Stromboli weist große Kahlflächen auf, nur um die menschlichen Siedlungen finden sich Obst- und Weingärten. Filicudi und Alicudi zeigen vor allem Getreidebau mit wenigen Obstbäumen und Weinstöcken. In Vulcano tritt die Vegetation weitgehend zurück und der größte Teil der Insel wird von Kahlflächen eingenommen. Das Klima ist typisch mediterran.

Fangversuche wurden Mitte bis Ende Mai 1956 auf Lipari, Panarea und Filicudi durchgeführt. In Lipari konnten nur wenige Individuen von *D. subobscura* neben den häufigen Arten *D. simulans*, *D. melanogaster*, *D. buzzatii*, *D. immigrans* und einigen selteneren *Drosophila*-Arten geködert, in Panarea und Filicudi fast nur *D. buzzatii* gefangen werden. Im November 1956 wurden nur in Lipari Fänge durchgeführt, die fast nur *D. melanogaster* und *D. simulans* ergaben. Ende April und Anfang Mai 1957 konnte in Lipari *D. subobscura* in größerer Zahl gefangen werden, wobei die Fangzahl anfänglich zunahm, um den 1. Mai ihr Maximum erreichte und dann allmählich abnahm. Es kann angenommen werden, daß *D. subobscura* im Frühjahr nur während weniger Wochen auf den Inseln auftritt, in der übrigen Zeit aber die Population so stark dezimiert ist, daß diese Art nicht geködert werden kann. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Goldschmidt (1956) in Israel gemacht. In Stromboli wurde im Frühjahr 1957 nur an zwei Tagen gefangen, auch dort fand sich *D. subobscura*, wenn auch die Ausbeute gering war. Es konnte somit *D. subobscura* in Lipari bei zwei Fängen (Frühjahr 1956 und 1957) und in Stromboli bei einem Fang (Frühjahr 1957) gewonnen werden. Die gleichzeitige Untersuchung einer Population aus dem benachbarten Küstengebiet von Sizilien, die für einen Vergleich mit den insulären Populationen interessant wäre, war infolge der kurzen Periode, in der *D. subobscura* gefangen werden kann, nicht mehr möglich.

Es wurden die von Burla (1951) beschriebenen Fangmethoden angewandt. Mit Ködermasse versehene Kübel wurden verteilt und mehrmals täglich die Fliegen mit Netzen abgefangen. Für die cytologische Untersuchung wurden Quetschpräparate der larvalen Speicheldrüsen hergestellt, in Orcein-Eisessig gefärbt und in Euparal eingeschlossen.

Standortanalyse Lipari und Stromboli

Eine ausreichende qualitative und quantitative Analyse liegt nur von Lipari Frühjahr 1957 vor, während die Untersuchungen Lipari Frühjahr 1956 und Stromboli Frühjahr 1957 in der Hauptsache nur qualitative Aussagen gestatten. Die Bezeichnung der Inversionen und Strukturtypen erfolgt in der von Kunze-Mühl und Sperlich (1955) angegebenen Weise. In den vorliegenden Untersuchungen konnte kein neuer Strukturtyp gefunden werden, sondern nur Strukturtypen, die bereits von Kunze-Mühl und Müller (1958) beschrieben wurden. Durch die Einkreuzung mit dem Standardstamm „Küsnacht" konnte jedoch für einige bereits beschriebene Inversionen geklärt werden, welchem Strukturtyp sie angehören. Die Inversion $O_{(16)}$ wurde von Kunze-Mühl und Müller zusammen mit $O_{(2)}$beobachtet. Wie die jetzige Untersuchung ergab, liegt für Lipari $O_{(16)}$ immer im Strukturtyp $O_{3\,-\,4\,-\,2\,-\,16}$. Es kann angenommen werden, daß auch Kunze-Mühl und Müller die Kombination $O_{3+4}/O_{3\,+\,4\,,\,2\,-16}$ gesehen, diese aber als $O_{3\,+\,4\,-\,2}/O_{3\,-\,4\,-16}$ gedeutet haben. Dieselben Autoren konnten an Hand ihres Materials nicht feststellen, ob $O_{(17)}$ zusammen mit $O_{(2)}$ als O_{2+17} vorliegt. Für Lipari konnte immer nur der Strukturtyp $O_{3\,+\,4\,+17}$ festgestellt werden. Interessant erscheint das Auftreten einer Inversion im O-Chromosom, deren Grenzen, soweit es die Analyse von Dauerpräparaten erlaubt, mit denen von $O_{(6)}$ übereinstimmen. Kunze-Mühl und Müller geben für $O_{(6)}$ einen eigenen Strukturtyp O_6 an, während in Lipari dieselbe Inversion in einer Struktur mit $O_{(3+4)}$ also im Strukturtyp $O_{3\,+\,4+6}$ auftritt. Dieser könnte durch einen Austausch zwischen

$O_{3\cdot4}$ und O_6 entstanden oder umgekehrt O_6 durch eine Trennung von O_{3-4-6} zustande gekommen sein. Ein solcher Austausch ist nur sehr selten zu erwarten, da der Abstand zwischen $O_{(3\cdot4)}$ und $O_{(6)}$ nur drei Unterzonen in der Chromosomenkarte beträgt und heterozygote Inversionen den Austausch über die Inversionsschlingen hinaus blockieren (KOSKE und MAYNARD SMITH 1954). Alle von KUNZE-MÜHL und MÜLLER beschriebenen Strukturtypen zeigten bisher große Konstanz. Nur in zwei Fällen traten Strukturtypen auf, deren Entstehung auf Austauschvorgänge in bestehenden Strukturtypenkombinationen zurückgeführt werden konnte. Es handelt sich um die Strukturtypen $O_{2\cdot17}$ und $O_{2\ 19}$. Für $O_{2\cdot17}$ konnte oben nachgewiesen werden, daß es sich um den Strukturtyp O_{3-4-17} handelt und es sind daher nur für den Strukturtyp $O_{2\ 19}$ Austauschvorgänge anzunehmen. Für die Strukturtypen $O_{3\cdot4\ 6}$ und O_6 wäre es auch möglich, daß sie unabhängig voneinander entstanden sind. Würde diese Annahme zutreffen, so wäre sie ein weiterer Beweis für die Positionseffekthypothese (SPERLICH 1959), die für den Einbau neuer Inversionstypen in die Population einen auf Heterosis beruhenden Selektionsvorteil annimmt, der nur von bestimmten Chromosomenstellen ausgeht.

Bei der Analyse des Fanges Lipari 1957 konnten 41 Weibchen und 37 Männchen ausgewertet werden. Von den Weibchen, die in der Natur begattet worden waren, wurden durchschnittlich je 6 Nachkommen untersucht. Die Männchen wurden einzeln mit virginellen Standardweibchen eingekreuzt und aus der Nachkommenschaft jeder Kreuzung 8 Larven präpariert. Diese Anzahl erlaubt es, den diploiden Chromosomensatz des Vaters zu bestimmen (DOBZHANSKY 1944) und somit bei der Untersuchung von 37 Männchen 74 Chromosomen je Autosom aus der Natur zu erfassen. Tabelle 1 zeigt das Ergebnis der Untersuchung der Nachkommen der Wildweibchen. Der Unterschied in der Gesamthäufigkeit der untersuchten Tiere für die verschiedenen Autosomen ergab sich, da nicht in allen Präparaten alle Chromosomen erfaßt werden konnten. Das leicht analysierbare J-Chromosom konnte auch in schlechten Präparaten bestimmt werden, während es für die Chromosomen U, E und O manchmal nicht möglich war.

Tabelle 2 zeigt das Ergebnis der Untersuchung der Männchen. Auffällig erscheint vor allem die große Seltenheit der Standardstrukturtypen in allen Chromosomen. Diese sind sonst sehr weit verbreitet (RICHTER und HÜNDLER 1955) und kommen in den meisten Populationen mit relativ hoher Häufigkeit vor. An ihre Stelle treten in Lipari andere Strukturtypen. Im A-Chromosom erreicht A_2, im J-Chromosom J_1, im U-Chromosom U_{1-2-8}, im E-Chromosom $E_{1-2-9-12}$ und im O-Chromosom $O_{3\cdot4}$ die größte Häufigkeit. Um auch die Wildweibchen-Nachkommen für die Beurteilung der Strukturtypenhäufigkeit in der Population heranziehen zu können, wurde mit Hilfe der Hardy-Weinberg-Formel die Frequenz der häufigeren Strukturtypen aus Tabelle 1 ermittelt und in Tabelle 3 wiedergegeben. Eine solche Berechnung ist nur dann zulässig, wenn die Selektion in der Larvengeneration keinen der homo- und heterozygoten Zustände bevorzugt oder benachteiligt. Da aber derartige Selektionsvorgänge nicht auszuschließen sind, können diese Häufigkeitsangaben nur als Näherungswerte angesehen werden.

Größenordnungsmäßig stimmen die Werte in Tabelle 2 (Männchen) und Tabelle 3 (Weibchen) gut überein. Nur die Unterschiede für das A- und das

Tabelle 1. *Lipari, Frühjahr 1957. Häufigkeit der verschiedenen heterozygoten Zustände unter den Nachkommen der Wildweibchen*

A-Chromosom ($n = 113$)*

Strukturtypenkombination	$\frac{A_2}{A_{St}}$	$\frac{A_2}{A_1}$	$\frac{A_1}{A_{St}}$	A_{hom}
Häufigkeit in %	30,1	11,5	1,8	56,6

J-Chromosom ($n = 250$)

Strukturtypenkombination	$\frac{J_1}{J_{St}}$	J_{hom}
Häufigkeit in %	25,2	74,8

U-Chromosom ($n = 224$)

Strukturtypenkombination	$\frac{U_{1+2+8}}{U_{1+2}}$	$\frac{U_{1+2+8}}{U_{1+2+4}}$	$\frac{U_{1+2+8}}{U_{1+2+3}}$	$\frac{U_{1+2}}{U_{1+2+4}}$	$\frac{U_{1+2}}{U_{1+2+3}}$	$\frac{U_{1+2+8}}{U_{1+2+7}}$	$\frac{U_{1+2+8}}{U_{1+2+6}}$	$\frac{U_{1+2}}{U_{1+2+6}}$	U_{hom}
Häufigkeit in %	33,5	11,6	10,7	4,5	4,0	3,1	1,3	0,9	30,4

E-Chromosom ($n = 220$)

Strukturtypenkombination	$\frac{E_{1+2}}{E_{1+2+9+3}}$	$\frac{E_{1+2}}{E_{1+2+9+12}}$	$\frac{E_{1+2+9}}{E_{1+2+9+12}}$	$\frac{E_{1+2+9+12}}{E_{St}}$	$\frac{E_{1+2+9}}{E_{1+2}}$	$\frac{E_{1+2+9+3}}{E_{1+2+9+12}}$	$\frac{E_{1+2+9}}{E_{St}}$	$\frac{E_{1+2+9}}{E_{St}}$	$\frac{E_{1+2}}{E_{St}}$
Häufigkeit in %	16,4	12,3	11,8	8,6	8,2	5,0	2,7	2,3	1,8

Strukturtypenkombination	$\frac{E_{1+2+9}}{E_{1+2+9+3}}$	$\frac{E_{1+2}}{E_8}$	$\frac{E_8}{E_{St}}$	E_{hom}
Häufigkeit in %	0,9	0,9	0,9	28,2

O-Chromosom ($n = 220$)

Strukturtypenkombination	$\frac{O_{3+4}}{O_{3+4+8}}$	$\frac{O_{3+4}}{O_{3+4+2+16}}$	$\frac{O_{3+4}}{O_{3+4+22}}$	$\frac{O_{3+4}}{O_{St}}$	$\frac{O_{3+4}}{O_{3+4+1}}$	$\frac{O_{3+4+2}}{O_{3+4+8}}$	$\frac{O_{3+4}}{O_{3+4+2}}$	$\frac{O_{3+4}}{O_{3+4+7}}$	$\frac{O_{3+4}}{O_{3+4+6}}$
Häufigkeit in %	16,4	7,7	4,1	5,0	3,6	3,2	1,8	1,8	0,9

Strukturtypenkombination	$\frac{O_{3+4+2}}{O_{3+4+17}}$	$\frac{O_{3+4+22}}{O_{3+4+17}}$	$\frac{O_{3+4}}{O_{3+4+17}}$	$\frac{O_{3+4+8}}{O_{3+4+6}}$	$\frac{O_{3+4+2+16}}{O_{3+4+17}}$	O_{hom}
Häufigkeit in %	0,9	0,9	0,5	0,5	0,5	52,2

* Für die Heterozygotenhäufigkeit im A (=X)-Chromosom wurden nur die weiblichen Nachkommen berücksichtigt.

J-Chromosom sind so groß, daß in der Strukturtypenhäufigkeit zwischen Männchen und Weibchen Unterschiede angenommen werden könnten. Auf eine statistische Prüfung wurde verzichtet, da die Werte von Tabelle 3 nur als ungenaue Schätzwerte angesehen werden können.

Tabelle 2. *Lipari, Frühjahr 1957. Strukturtypenhäufigkeit bei den Männchen in Prozenten* ($n = 74$ für die Autosomen, $n = 37$ für das *A*-Chromosom)

A_{St}	35,1	U_{1+2+8}	51,4	$E_{1+2+9+12}$	39,1	O_{3+4+1}	2,7
A_1	5,4	U_{1+2+4}	5,4	$E_{1+2+9+3}$	10,8	O_{3+4+2}	9,4
A_2	59,5	U_{1+2+3}	8,1	E_8	4,1	O_{3+4+17}	1,4
J_{St}	6,8	U_{1+2+6}	5,4	O_{St}	1,4	$O_{3+4+2+16}$	2,7
J_1	93,2	E_{St}	1,4	O_{3+4}	64,8	O_{3+4+7}	1,4
U_{St}	2,7	E_{1+2}	29,7	O_{3+4+8}	14,8	O_{3+4+6}	1 4
U_{1+2}	27,0	E_{1+2+9}	14,9				

Tabelle 3. *Lipari, Frühjahr 1957. Strukturtypenhäufigkeit bei den Weibchen in Prozenten*

A_{St}	19 8	J_1	85,2	E_{1+2}	27,2	Übriges E	19,8
A_1	7,1	U_{1+2}	31,0	E_{1+2+9}	15,2	O_{3+4}	70,3
A_2	70,5	U_{1+2+8}	50,0	$E_{1+2+9+12}$	25,1	O_{3+4+8}	11,3
J_{St}	14,8	Übriges U	19,0	$E_{1+2+9+3}$	12,7	Übriges O	18,4

Tabelle 4. *Lipari, Frühjahr 1956. Strukturtypenhäufigkeit bei den Weibchen und Männchen in Prozenten* ($n = 34$ für die Autosomen, $n = 23$ für das A-Chromosom)

A_{St}	34,8	U_{1+2}	23,5	E_{1+2}	11,7	O_{3+4}	61,8
A_1	13,0	U_{1+2+8}	55,9	E_{1+2+9}	32,4	O_{3+4+8}	14,7
A_2	52,2	U_{1+2+4}	5,9	$E_{1+2+9+12}$	35,3	O_{3+4+1}	2,9
J_{St}	8,8	U_{1+2+3}	5,9	$E_{1+2+9+3}$	5,9	O_{3+4+2}	5,9
J_1	91,2	U_{1+2+6}	8,8	E_8	14,7	$O_{3+4+2+16}$	14,7

Im Frühjahr 1956 konnten nur 5 Männchen und 6 Weibchen gefangen werden. Die Männchen wurden mit Standard-Weibchen eingekreuzt. Von den Nachkommen der Weibchen wurden zahlreiche Präparate gemacht, außerdem einige F_1-Männchen mit dem Standardstamm eingekreuzt und die F_2 ebenfalls präpariert. Dadurch war es möglich, die Strukturtypen der Wildweibchen und der Wildmännchen, von denen sie in der Natur begattet worden waren, zu erfassen. Es konnten somit je Weibchen vier verschiedene Chromosomen je Autosom und drei verschiedene je A (= X)-Chromosom bestimmt werden. Die Häufigkeit der einzelnen Strukturtypen ist in Tabelle 4 angegeben. Der Vergleich mit Tabelle 2 und 3 zeigt, daß die Strukturtypenhäufigkeit im Frühjahr 1956 mit der vom Frühjahr 1957 weitgehend übereinstimmt. Das bedeutet, daß die Population von Lipari im Gleichgewicht ist und trotz der großen Dezimierung während der Sommer-, Herbst- und Wintermonate die Häufigkeitsverteilung der Strukturtypen aufrecht erhalten bleibt. Im Frühjahr 1957 wurde auch in Stromboli gefangen. Es konnten nur 5 Männchen und 3 Weibchen ausgewertet werden. Da die Gesamtzahl der erfaßten Chromosomen zu klein ist, um quantitative Aussagen zu machen, mögen hier nur die gefundenen Strukturtypen angeführt werden. Es fanden sich: A_2, A_{St}; J_1; U_{1+2}, U_{1+2+8}; E_{1+2}, $E_{1+2+9+12}$, $E_{1+2+9+3}$; O_{3+4}, O_{3+4+8} und O_{St}.

Diskussion der Ergebnisse

Richter und Hündler (1955) kamen auf Grund ihrer qualitativen Untersuchungen über die geographische Verbreitung der verschiedenen Strukturtypen zu dem Ergebnis, daß die Standardanordnung, wie sie der Stamm „Küsnacht" repräsentiert, für alle Chromosomen weit verbreitet ist. Sie nahmen deshalb an, daß die Standardstrukturen phylogenetisch alt sind. Wie Tabelle 2 und 3 zeigen, kommt die Standardanordnung für die vier Autosomen in Lipari nur mit sehr geringer Häufigkeit vor. Auch Goldschmidt (1956) fand in Israel die Standardstrukturen nur sehr selten. Mit Sicherheit konnte dort nur A_{St}, J_{St} und E_{St} nachgewiesen werden, während O_{St} und U_{St} in der untersuchten Population zu fehlen schien. In Österreich treten die Standardstrukturtypen sehr häufig auf: A_{St}: 57,2, J_{St}: 56,7, U_{St}: 69,7, E_{St}: 76,9 und O_{St}: 74,4% (Kunze-Mühl, Müller und Sperlich 1958).

Tabelle 5. *Vergleich der Strukturtypenhäufigkeit zwischen den Populationen „Lipari" ($n = 74$) und „Österreich" ($n = 360$)*

Strukturtyp	Häufigkeit in %		χ^2	p
	Lipari	Österreich		
A_{St}	35,1	57,2	6,0177	0,02—0,01
A_1	5,4	35,6	13,1823	$<0{,}001$
A_2	59,5	7,2	61,9092	$\ll 0{,}001$
J_{St}	6,8	56,7	61,2447	$\ll 0{,}001$
J_1	93,2	43,3	61,2447	$\ll 0{,}001$
U_{St}	2,7	69,7	113,4038	$\ll 0{,}001$
U_{1+2}	27,0	11,8	11,8275	$<0{,}001$
U_{1+2+6}	5,4	14,4	4,4624	0,05—0,02
U_{1+2+8}	51,4	1,1	177,2524	$\ll 0{,}001$
E_{St}	1,4	76,9	152,3417	$\ll 0{,}001$
E_8	4,1	13,6	5,3163	0,05—0,02
E_{1+2}	29,7	3,1	62,1652	$\ll 0{,}001$
E_{1+2+9}	14,9	6,4	6,1075	0,02—0,01
$E_{1+2+9+12}$	39,1	0,0	—	—
$E_{1+1+9+3}$	10,8	0,0	—	—
O_{St}	1,4	74,4	139,1683	$\ll 0{,}001$
O_{3+4}	64,8	10,6	113,9449	$\ll 0{,}001$
O_{3+4+8}	14,8	1,4	31,3941	$\ll 0{,}001$

In Tabelle 5 ist die Strukturtypenhäufigkeit von Lipari der von Österreich gegenübergestellt. Es wurden jeweils nur jene Strukturtypen verglichen, die in einer der beiden Populationen eine größere Häufigkeit als 10% haben.

Die Strukturtypenhäufigkeit der beiden Populationen wurde mit der χ^2-Methode verglichen. Für alle Standardstrukturtypen der Autosomen ergibt sich eine hohe Signifikanz der Unterschiede. Das gleiche gilt für die zwei Inversionstypen des A-Chromosoms, den Inversionstyp des J-Chromosoms und für je zwei komplexe Inversionstypen des U-, des E- und des O-Chromosoms. Nur für A_{St}, E_8 und U_{1+2+6} ist der Unterschied schwach gesichert. Für $E_{1+2+9+12}$ und $E_{1+2+9+3}$ wurde kein χ^2 berechnet. Diese Strukturtypen kommen in der Stichprobe aus Österreich unter 360 untersuchten E-Chromosomen nicht vor und es scheint die Annahme berechtigt, daß diese Strukturtypen hier fehlen. Goldschmidt (1956) nimmt an, daß $E_{(12)}$ mit der Inversion „Eva" von Stumm-Zollinger (1953) identisch ist. Von Stumm-Zollinger wurde „Eva" in den Stichproben Fetan und Vitznau nicht gefunden, kommt aber in allen anderen Populationen aus W-Europa mit geringer Häufigkeit vor, erreicht allerdings in der Population von Lissabon 36,3%. Diese Daten sind mit den Angaben über die Strukturtypenhäufigkeit nicht ohne weiteres zu vergleichen. Immerhin zeigen sie, daß $E_{1+2+9+12}$ in allen meeresnahen und südlichen Gebieten häufig, in allen nördlichen und meeresfernen Gebieten aber selten ist oder überhaupt

nicht vorkommt. Der signifikante Frequenzunterschied für die häufigeren Strukturtypen der liparischen und österreichischen Population erscheint deshalb von Bedeutung, da bis jetzt für *D. subobscura* noch kein Beweis für solche Unterschiede erbracht wurde. Ähnlich starke Unterschiede erhält man bei einem Vergleich der Strukturtypenhäufigkeit von Lipari mit der von GOLDSCHMIDT (1958) untersuchten Population von Oranim in Israel. Ebenso weichen auch die Standorte Wien und Oranim in der Strukturtypenhäufigkeit stark voneinander ab.

Vergleiche zwischen den einzelnen Populationen der verschiedenen Gebiete wurden bis jetzt nur für die Inversionshäufigkeit durchgeführt. Solche Vergleiche erscheinen aber insofern von geringerem Aussagewert, als das Auftreten bestimmter Inversionen von dem Zusammenspiel mehrerer Strukturtypen und deren relativer Häufigkeit abhängt. Es finden sich z. B. $E_{(1)}$ und $E_{(2)}$ in den Strukturtypen E_{1+2}, E_{1+2+9}, $E_{1+2+9+12}$ und $E_{1+2+9+3}$. $E_{(1)}$ und $E_{(2)}$ werden häufig auftreten: 1. wenn einer der angeführten Strukturtypen häufig in einer Population vorkommt zusammen mit einem anderen Strukturtyp, der $E_{(1)}$ und $E_{(2)}$ nicht enthält, also z. B. E_{St} oder E_8; 2. wenn alle angeführten Strukturtypen mit mittlerer Häufigkeit nebeneinander vorkommen zusammen mit E_{St} oder E_8. Die Inversionen $E_{(1)}$ und $E_{(2)}$ werden selten vorkommen: 1. wenn alle angeführten Strukturtypen sehr selten in einer Population sind; 2. wenn einer der angeführten Strukturtypen sehr häufig ist, z. B. E_{1-2}. Die anderen (z. B. E_{1+2+9}, $E_{1+2+9+12}$ oder $E_{1+2+9+3}$) werden dann vorwiegend mit diesem Strukturtyp heterozygote Zustände bilden, in denen die Inversionsschlingen $E_{(1)}$ und $E_{(2)}$ nicht auftreten und daher nicht registriert werden; 3. wenn Strukturtypen, die $E_{(1)}$ und $E_{(2)}$ nicht enthalten, sehr selten sind, die Strukturtypen mit $E_{(1)}$ und $E_{(2)}$ aber relativ häufig sind. Die Strukturtypen mit $E_{(1)}$ und $E_{(2)}$ werden dann vorwiegend miteinander heterozygote Zustände bilden (z. B. $E_{1+2}/E_{1+2+9+3}$), in denen die Inversionsschlingen $E_{(1)}$ und $E_{(2)}$ nicht auftreten. $E_{(1)}$ und $E_{(2)}$ fehlen in Populationen, in denen: 1. Strukturtypen, die $E_{(1)}$ und $E_{(2)}$ enthalten, fehlen oder 2. Strukturtypen, die $E_{(1)}$ und $E_{(2)}$ nicht enthalten, fehlen. Da die Verhältnisse für die anderen Chromosomen ebenso liegen, wurde auf eine direkte Analyse der Strukturtypenhäufigkeit größter Wert gelegt. Der Nachteil einer solchen Strukturtypenanalyse durch Einkreuzung der Wild-Männchen mit einem Standardstamm gegenüber einer Untersuchung der Inversionshäufigkeit durch die Analyse je eines Nachkommens eines Wild-Weibchens liegt im größeren Arbeitsaufwand. Leider liegen über die meisten bisher untersuchten Lokalpopulationen von *D. subobscura* nur Angaben über die Inversionshäufigkeit vor. Ein Vergleich mit der liparischen Inselpopulation ist daher sehr erschwert. Ein Vergleich der Inversionshäufigkeit wurde nur für die Populationen Lipari und Israel versucht. Die beiden Populationen leben unter vergleichbaren ökologischen Bedingungen, wie schon die kurze Aktivitätsperiode während des Frühjahrs zeigt. Aus allen Rohprotokollen von Lipari wurden die Frequenzen der verschiedenen Inversionen ermittelt und diese mit denen von Israel, „Quiryat-Anavim" (GOLDSCHMIDT 1956), verglichen. Es ergeben sich deutliche, meist stark signifikante Unterschiede. Besonders auffällig ist die Häufigkeit von 51,3% für die Inversion $U_{(8)}$ in Lipari, die in Israel vollkommen fehlt. Umgekehrt treten in Israel die Inversionen $J_{(3)-(4)}$ mit 32,2% auf, fehlen aber in Lipari. Für $U_{(7)}$, $E_{(3)}$ und $E_{(8)}$ ergeben sich hoch signifikante Unterschiede, für $U_{(4)}$, $E_{(9)}$ und $E_{(1-2)}$ weichen die Frequenzen eben-

falls deutlich voneinander ab. Es bestehen also zwischen den Populationen in Israel und auf Lipari trotz der Ähnlichkeit der ökologischen Verhältnisse weitgehende qualitative und quantitative Unterschiede, wie auch schon der Vergleich der Strukturtypenhäufigkeit gezeigt hat, die auf der geographischen Distanz beruhen dürften. Gemeinsam ist den beiden Populationen die große Seltenheit der Standardanordnung für die vier Autosomen im Gegensatz zu der mitteleuropäischen Population.

Das Ausmaß des strukturellen Polymorphismus kann zahlenmäßig durch die Angabe des Heterozygotiegrades und der Inversionsdichte erfaßt werden (Kunze-Mühl, Müller und Sperlich 1958). Stumm-Zollinger und Goldschmidt (1959) berechneten den „Index der freien Rekombination (IFR)" (Carson 1955) und benützten ihn ebenfalls als Maß für den strukturellen Polymorphismus. Alle diese Zahlenwerte wurden für die Population von Lipari ermittelt. Die Angaben beziehen sich lediglich auf die Autosomen. Sie sind mit denen von Stumm-Zollinger und Goldschmidt (1959) nicht unmittelbar vergleichbar, da dort alle Berechnungen mit Einbeziehung des A (=X)-Chromosoms durchgeführt sind. In Tabelle 6 sind der Heterozygotiegrad, die Inversionsdichte und der IFR von Lipari und Wien (Kunze-Mühl, Müller und Sperlich 1958) einander gegenübergestellt.

Tabelle 6. *Vergleich des Heterozygotiegrades, der Inversionsdichte und des IFR der Populationen Lipari und Wien*

	Lipari	Wien	d	t	p
Heterozygotiegrad	2,07	1,61	0,46	4,7717	$<0{,}001$
Inversionsdichte .	3,27	3,08	0,19	0,9396	0,3—0,4
IFR	83,85	84,78	0,93	1,0246	0,3—0,4

Es zeigt sich eine starke Abweichung im Heterozygotiegrad zugunsten der Population von Lipari, während Inversionsdichte und IFR gut übereinstimmen. Diese Tatsache erscheint deshalb interessant, da sie der Erwartung, daß Inselpopulationen durch die Wirkung des „genetic drift" homogener sein müßten, widerspricht. Für *D. willistoni* fand Dobzhansky (1957) bei der Untersuchung von Wildpopulationen der Großen und Kleinen Antillen, daß das Ausmaß des chromosomalen Polymorphismus, gemessen an der Inversionsdichte und der Anzahl der gefundenen Strukturtypen je Chromosom, im allgemeinen direkt proportional der Größe der verschiedenen untersuchten Inseln ist. Ergänzt wurde diese Angabe durch Untersuchungen von Townsend (1958), der für Wildpopulationen der Großen Antillen feststellte, daß deren Inversionsdichte nur geringe Unterschiede zwischen verschiedenen Orten, Seehöhen und Jahreszeiten derselben Insel aufweist. Er führt dies auf die relative Verarmung des strukturellen Polymorphismus zurück.

Die nächste Frage war, ob sich in Lipari heterozygote Zustände in allen Chromosomen häufiger finden, oder ob nur ein oder zwei Chromosomen für den hohen Heterozygotiegrad verantwortlich sind. Als Maß für den Heterozygotiegrad kann auch der Prozentsatz der homozygoten Tiere in der untersuchten Population herangezogen werden, nur sind die Zahlenwerte anders zu bewerten. Da sich bei Goldschmidt (1956) für Israel und bei Kunze-Mühl, Müller und Sperlich (1958) für Wien Angaben über die Homozygotenhäufigkeit finden, wurde auch für Lipari die Homozygotenfrequenz je Chromosom ermittelt und in Tabelle 7

der von Israel und Wien gegenübergestellt und der Unterschied mit der χ^2-Methode geprüft.

Wie man aus Tabelle 7 ersehen kann, sind fast alle Unterschiede statistisch sehr gut gesichert. Nur für das J-Chromosom ergibt sich in der Homozygotenhäufigkeit für Israel und Lipari ein nur sehr schwach gesicherter Unterschied ($p \approx 0{,}05$). Für den Häufigkeitsunterschied im O-Chromosom zwischen Lipari und Wien ergibt sich ein p von etwa 0,02. Wie die Tabelle 7 zeigt, sind für das U- und das E-, aber auch für das O-Chromosom die Homozygotenfrequenzen in Lipari niedriger als in Wien und Israel. Im J-Chromosom liegen die Homozygotenfrequenzen in Lipari höher als in den beiden anderen Populationen (teilweise nur schwach gesichert) und für das A-Chromosom sind die Werte von Israel höher, die von Wien niedriger als in Lipari. Es zeigt sich also, daß der hohe Heterozygotiegrad der liparischen Population nur auf die Verteilung in den Chromosomen U, E und O zurückzuführen ist, während die Chromosomen A und J keinen Anteil daran haben.

Tabelle 7. *Vergleich der Homozygotenhäufigkeit in den Populationen Israel, Lipari und Wien*

	Israel %	Lipari %	Wien %	χ^2: Lipari-Wien	χ^2: Lipari-Israel
A_{hom}	83,4	56,6	37,7	12,2841	23,5283
J_{hom}	66,5	74,9	54,0	32,7983	3,9736
U_{hom}	58,3	30,4	51,3	29,6182	10,6622
E_{hom}	43,5	28,2	57,0	55,6659	11,4192
O_{hom}	83,0	52,2	60,9	5,1218	48,9278

Durch die insuläre Isolation und die damit verbundene, wenn auch leichte Inzucht, wäre eine Verarmung des strukturellen Polymorphismus auf statistischem Wege zu erwarten. Wie leicht gezeigt werden kann, ergäbe sich daraus auch eine Verminderung des theoretisch maximal erreichbaren Heterozygotiegrades (SPERLICH 1959). Für zwei Strukturtypen je Chromosom ist die maximale Heterozygotenfrequenz 50,0%, für drei 66,7%, für vier 75,0% usw. Wie die Untersuchung zeigt, ist in Lipari sowohl die Anzahl der verschiedenen Strukturtypen für die Chromosomen U, E und O als auch der Heterozygotiegrad relativ hoch. Für die Chromosomen A und J liegen nur drei bzw. zwei verschiedene Strukturtypen vor, wobei für das A-Chromosom zu berücksichtigen ist, daß es das Geschlechtschromosom darstellt, während sich die beiden Strukturtypen des J-Chromosoms J_{st} und J_1 nur durch eine kleine, einfache Inversion voneinander unterscheiden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die liparische Population sich deutlich von den anderen bisher untersuchten Populationen in der strukturellen Zusammensetzung unterscheidet, jedoch bei einem Vergleich mit diesen keine deutlichen Isolationserscheinungen festzustellen sind. Dies könnte auf einer zu wenig strengen Isolation oder aber auch darauf beruhen, daß durch den positiven Heterosiseffekt der Strukturheterozygotie, der auch für *D. subobscura* experimentell nachgewiesen werden konnte (SPERLICH 1958), einer Isolationswirkung weitgehend das Gleichgewicht gehalten wird. Auch STUMM-ZOLLINGER und GOLDSCHMIDT (1959) konnten zeigen, daß bei *D. subobscura* in der Population von Israel keine Verarmung des strukturellen Polymorphismus eingetreten ist. Die Autoren sind allerdings der Meinung, durch die Feststellung eines Unterschiedes im IFR zwischen den Populationen der Schweiz und Israels und in der Verteilung des Polymorphismus auf die einzelnen Chromosomen (STUMM-ZOLLINGER und GOLDSCHMIDT 1959) ein Merk-

mal einer Marginalpopulation für Israel festgestellt zu haben. Es ist die Frage, inwieweit die Population von Israel und von Lipari als Marginalpopulationen angesehen werden können. Nach den für *D. subobscura* in diesen Ländern nicht mehr optimalen Lebensbedingungen, die die Vermehrungsperiode der Art auf eine kurze Zeitspanne beschränken, und nach der bisher ermittelten Ausdehnung des Verbreitungsgebietes der Art könnte dies der Fall sein. Der Ausbildungsgrad des strukturellen Polymorphismus läßt allerdings deutliche Kennzeichen einer Marginal-Population vermissen.

Zusammenfassung

1. An einer Population von *Drosophila subobscura* auf der Insel Lipari wurde im Frühjahr 1957 eine qualitative und quantitative Untersuchung der chromosomalen Strukturtypenmannigfaltigkeit durchgeführt. Kleinere Untersuchungen der gleichen Art wurden im Frühjahr 1956 auf Lipari und im Frühjahr 1957 auf Stromboli vorgenommen.

2. Ein Vergleich der Ergebnisse mit einer gleichartigen Analyse einer Population in der Umgebung von Wien ergibt einige qualitative, vor allem aber starke quantitative Unterschiede in der Ausbildung des chromosomalen Polymorphismus. Das gleiche gilt für einen Vergleich mit einer Population in Israel. Mit dieser hat die Population die Seltenheit der Standardstrukturtypen gemeinsam, im Gegensatz zu den mitteleuropäischen Populationen.

3. Der Grad des chromosomalen Polymorphismus ist trotz der insulären Isolation ebenso hoch wie bei den kontinentalen Populationen. Dies könnte mit dem starken, auf Heterosis beruhenden Selektionsvorteil der strukturellen Heterozygoten erklärt werden. Kennzeichen einer Marginal-Population konnten in Lipari nicht gefunden werden.

Herrn Prof. Dr. F. Mainx möchte ich für seine wertvollen Hinweise und Ratschläge danken.

Literatur

Burla, H.: Systematik, Verbreitung und Ökologie der *Drosophila*-Arten der Schweiz. Rev. suisse Zool. **58**, 23—175 (1951).

Carson, H. L.: Variation in genetic recombination in natural populations. J. comp. Cell. Physiol. **45**, Suppl. 2, 221—236 (1955).

Dobzhansky, Th.: Chromosomal races in *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. Publ. Carneg. Inst. **554**, 47—144 (1944).

— Genetics of natural populations. XXVI. Chromosomal variability in islands and continental populations of *Drosophila willistoni* from Central America and the West Indies. Evolution **11**, 280—293 (1957).

Goldschmidt, E.: Chromosomal polymorphism in a population of *Drosophila subobscura* from Israel. J. Genet. **54**, 474—496 (1956).

— Polymorphism and coadaptation in natural populations of *Drosophila subobscura*. Proc. Tenth Int. Congr. Ent. (Montreal) **2**, 821—828 (1958).

Koske, Th., and J. Maynard Smith: Genetics and cytology of *Drosophila subobscura*. X. The fifth linkage group. J. Gent. **52**, 521—541 (1954).

Kunze-Mühl, E., u. E. Müller: Weitere Untersuchungen über die chromosomale Struktur und die natürlichen Strukturtypen von *Drosophila subobscura*. Chromosoma (Berl.) **9**, 559—570 (1958).

— — u. D. Sperlich: Qualitative, quantitative und jahreszeitliche Untersuchungen über den chromosomalen Polymorphismus natürlicher Populationen von *Drosophila subobscura* in der Umgebung von Wien. Z. Vererb.-Lehre **89**, 636—646 (1958).

Kunze-Mühl, E., E. Müller u. D. Sperlich: Inversionen und chromosomale Strukturtypen bei *Drosophila subobscura*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 65—84 (1955).

Richter, H., u. M. Hündler: Die geographische Verbreitung der chromosomalen Strukturtypen von *Drosophila subobscura*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 85—92 (1955).

Sperlich, D.: Modellversuche zur Selektionswirkung verschiedener chromosomaler Strukturtypen von *Drosophila subobscura*. Z. Vererb.-Lehre **89**, 422—436 (1958).

- - Experimentelle Beiträge zum Problem des positiven Heterosiseffektes bei der strukturpolymorphen Art *Drosophila subobscura*. Z. Vererb.-Lehre **90**, 273—287 (1959).

Stumm-Zollinger, E.: Vergleichende Untersuchungen über die Inversionshäufigkeit bei *Drosophila subobscura* in Populationen der Schweiz und Südwesteuropas. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **85**, 382—407 (1953).

- and E. Goldschmidt: Geographical differentiation of inversion system in *Drosophila subobscura*. Evolution **13**, 89—98 (1959).

Townsend, J. I.: Chromosomal polymorphism in Caribbean Island populations of *Drosophila willistoni*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **44**, 38—42 (1958).

Dr. Diether Sperlich,
Institut für Allgemeine Biologie der Universität, Wien IX (Österreich),
Schwarzspanierstr. 17

Zeitschrift für Vererbungslehre 92, 85—99 (1961)

Institute of Genetics, University of Milan, Milan (Italy)

THE USE OF INTERCHANGES INVOLVING B-TYPE CHROMOSOMES IN STUDYING ARTIFICIAL MUTAGENESIS IN MAIZE

By

G. Bellini, A. Bianchi and E. Ottaviano

With 7 Figures in the Text

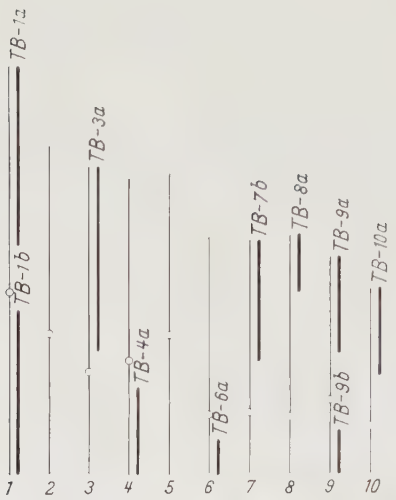
(Received February 10, 1961)

Radiation genetics in higher plants has been greatly fostered with experiments in barley and in maize, not to mention more specific results with the chromosomes of *Tradescantia*, *Trillium* and *Vicia*. In the former two species and especially in maize two main aptitudes have been developed: one has been dealing with the study of genetic effects wherever they might be artificially induced and detected, the other one selects single loci as well definite target of mutagenic action. The first kind of experimental approach has been materialized, both in barley and in maize with the historical paper by Stadler (1930), and is still in great favor especially in the modern radiation genetics of barley. The second type of investigation has become more and more preferred in maize radiogenetics, thanks to the use of advantageous endosperm and/or seedling genetic markers, and after the mentioned A. stressed the importance of intensive study of individual loci. In the first case analysis of F_2, or even F_3, are needed, and still a significant fraction of mutants may not be recovered because of non transmissibility and/or unviability of some mutations; in the second one we may be confronted with the difficulty of extrapolating conclusions obtained from very restricted and selected chromosomal regions.

The experiments described in this paper constitute a sort of intermediate approach to the study of artificial mutagenesis, and seem to offer also some clue to the problem of the nature of mutation in maize, where the spectra of spontaneous and artificial mutations appear strikingly different (Bianchi 1961).

Material and methods

The behavior of A-B chromosome interchanges. As described firstly by Roman (1947, 1948) and confirmed later (Roman and Ullstrup 1951, Bianchi 1957, 1960), a maize plant possessing a *B* centromere region with a translocated *A* segment very frequently shows non disjunction of the compound chromosome (indicated as B^A) in the second microspore mitosis. Consequently, in the same pollen grain, one of the male gametes has two of these chromosomes, its partner none, and, following double fertilization, three combinations are expected: (I) hypoploid endosperm with hyperploid embryo, and (II) hyperploid endosperm with hypoploid embryo, both because of non disjunction and of the two possible types of fertilization; (III) normal chromosome complement both in embryo and in endosperm, following normal disjunction. If pollen of types (I) and (II), which is much more abundant than type (III) (cited papers, and Bianchi, Bellini, Contin, and Ottaviano, unpubl.) is fertilizing normal and/or treated plants, in the hypoploid F_1 endosperm and plant any mutation which has occurred in the corresponding segment of the normal or treated chromosome will be expressed, since it will



be hemizygous. Furthermore each hypoploid F_1 tests for mutation of all the loci lying within this segment (Laughnan and Coe 1953). Since 10 *A—B* translocation stocks involving segments of different size (Fig. 1) are presently available, an estimate has been made of the number of "genes" likely to be present in each of the different segments (Bianchi 1961):

TB—1a	640	TB—7	330
TB—1b	600	TB—8	210
TB—3	660	TB—9a	310
TB—4	310	TB—9b	140
TB—6	120	TB—10	310

If artificial average "gene" mutability is just slightly higher than the spontaneous one, with

Fig. 1. Diagram showing relative lengths of maize pachytene chromosomes, and location of centromeres (light lines) together with their segments translocated to B centromeres (heavy lines)

Fig. 2. Ears of A 159 × TB—3: on top a normal one, in the middle a semisterile one, and at the bottom progeny of the latter, half normal and half semisterile (the four central ears)

one hundred or more "genes" susceptible of mutating, the probability of obtaining and detecting immediately in F_1 mutants should be conspicuous.

Irradiation. X-rays were obtained from a Gilardoni T250/12 unit operated at 220 kVp, 12 mA. The radiation was filtered by 4 mm Al and the dose rate was approximately 200 r per minute. The doses given in 1959 were 1—2—3 and 4 kr, and 4—8 and 16 kr in 1960.

Fig. 3. Ears of WF9 × TB—3: on top a normal one, in the middle a semisterile one, and at the bottom progeny of the latter, half normals (1st and 3rd ears) and half semisteriles (2nd and 4th ears)

While the field conditions were good during the 1959 spring as to obtain practically no decrease in germination and survival, such was not the case for 1960, not to mention the fact that in the latter case also heavier treatments were applied.

Material. The treated material was chiefly constituted by inbred lines: A158, A158T, WF9 and WF9T (*T* — Texas factor for cytoplasm male sterility). The treated seeds in 1959 had a moisture content of about 12%; in 1960 samples with about 8 and 7% of water content were used. The above mentioned *TB—A* pollinator stocks were those produced by Roman, and obtained directly by him or other sources. They possess appropriate genetic background to detect promptly endosperm and seedling mutants, included, in most cases, aleurone and plant color mutants.

Scoring. The F_1 ears were accurately scrutinized and a first classification was made according to the seed setting. If the number of seeds was less than 25 the ears were discarded for further consideration regarding presence of mutants: if higher, annotation was made

whether any significant rate of possible mutant kernels was apparent; in ears presenting abundance of seeds the cases of semisterility were annotated. Progeny tests of such semisterile individuals proved that (43 out of the 45 tested) they were actually due to chromosomal aberrations (Figs. 2 and 3). Annotation was, in the same time, made of the presence of significant frequency of defective seeds and of any other endosperm trait deviating from the expected. Taking into consideration the fact that it was dealt with ears produced by plants grown from treated seeds, it is obviously expected that if a genetic alteration has been induced in the embryo cells, this event certainly involves, in the greatest majority, only one of the homologous chromosomes: that is, practically, only heterozygous mutations should be looked for. If the cell lineage deriving from the mutated cell will form the entire ear and the $^1/_2$ mutated gametes have normal viability, the percent of mutant endosperms or mutant seedlings will depend chiefly on the frequency of non disjunction of B^A chromosomes and on the value of "directed fertilization". Since the rate of non-disjunction may vary from about 100% to about 70%, it follows that the previous $^1/_2$ probability may lower to about $^1/_3$: and, since the ratio of the hyperploid gamete fertilizing the egg nucleus to the hypoploid one uniting with the polar nuclei ("directed fertilization") varies approximatively from 1:1 to 3:1 (Roman 1948; Bianchi, Bellini, Contin and Ottaviano, unpubl.) such $^1/_3$ may vary from $^1/_6$ ($^1/_2 \cdot {}^1/_3$) to $^1/_{18}$ ($^1/_2 \cdot {}^1/_3 \cdot {}^1/_3$). Consequently have been regarded as cases of mutation those in which at least 5% of the kernels presented aberrant characters (an example in Fig. 4).

Fig. 4. Ears of A158T × TB—3: at left a normal one, at right another one showing several colorless endosperm kernels, as a result of mutation at one of the several *Bh (Blotched aleurone)* factors involved in the production of such trait

To detect seedlings mutants a sample of 25 seeds from every ear was planted: the detection amongs them of 1 clearly deviating phenotype (corresponding practically, on the average, to a percentage similar to the above mentioned one, since germination down to 21 seeds was considered still normal) was also accepted as indication of mutation affecting seedling characters. Of course, because in several F_1 it was possible to identify, to some extent (cited papers), the hypoploid embryos, the sowing in such cases, was restricted to them, so as to increase the chances of detecting possible

seedling mutants (an example in Fig. 5). In few cases the mutant phenotypes were not very clearly distinct; consequently the occurrence was reported as ·5 instead of 1 case of mutation. When germination was of 20 seeds or less a lethal condition was assumed at work.

Pollen treatment. A minor sample, whose fertilizing pollen was previously irradiated with about 1000 r, has been analized in the same above described way after their crosses with TB—A stocks were available in 1960.

Fig. 5. A case of seedling mutant detected by using TB—A stocks on treated material

Results

They are analytically presented in Table 1—4 for the 1959 data. Table 5 shows the corresponding results from 1960 experiments: since the slightly different water content of the treated seeds in such year did not significantly modify the various kinds of detected mutations all the 1960 data have been condensed in this table. Since the first question is whether the treatment is efficient in increasing the different types of detectable mutations, Table 6 contrasts the data from the control to those from all the treated material, irrespective of the seed parent type and of the chromosome segment considered, but separately for 1959 and 1960 data. While for the semisterile type ears the differences in frequency are obvious and clearly due to treatment and to the different doses adopted in the two different years. for other characters or mutations the results deserve some further comment. The ears with poor seed setting are not clearly affected by the treatment in 1959, while they are greatly increased in 1960, possibly as a consequence of the heavier treatments: the poor seed setting high both in control and treated material in '59 may be due to unfavorable environmental conditions as well as to the fact that being available during such year relatively scarce pollinator plants the artificial pollinations were carried out with small samples of pollen, and it is not ascribable to the esclusion in 1960 of several pollinator stocks used in 1959, since the data arranged in Table 7 according to the different pollinators exclude it. This seems substantiated by the fact that while in '59 data there is no correlation between *r* dose and % of poor ears, in '60 material the increase of the latter with the increasing doses is unquestionable (Table 8). Under such conditions it is correct to consider the poor seed setting as an index of chromosomal aberrations, as has been done, for instance, by Stadler (1931). However, as seen, under other experimental conditions a similar assumption may be greatly misleading. Pooling the poor ear class with the semisterile one, while with '60 data this strengthens the positive dosage-effect relationship, it makes

Table 1. *Results obtained in crosses on A158 (1959)*

Translocation	Treatment r	Ears with few seeds		Ears with good seed setting	Endosperm mutations		Seedling mutations		Lethals		Semisterile ears	
		N	%		*N*	%	*N*	%	*N*	%	*N*	%
TB—1a	0	2	4,6	41					5	12,2		
	1000	1	1,9	52			2	3,8	1	1,9	1	1,9
	2000	11	7,0	147	1	0,7	1	0,7	10	6,8	2	1,4
	3000	1	2,6	38					1	2,6	1	2,6
	4000	2	6,7	28					2	7,1		
TB—1b	0	2	4,9	39								
	1000			15								
	2000			41							1	2,4
	3000			6			1	16,7				
	4000			6								
TB—3	0	7	6,4	103	2	1,9			5	4,8		
	1000	26	13,1	172	4	2,3	1	0,6	4	2,3		
	2000	16	4,6	332	26	7,8	10	3,0	9	2,7	13	3,9
	3000	73	33,3	146	1	0,7	2	1,4	8	5,5	6	4,1
	4000	2	1,1	172	6	3,5	1	0,5	4	2,3		
TB—4a	0			1								
	2000			3								
	4000			2					1	50,0		
TB—6a	0	3	3,3	88					3	3,4		
	1000	5	21,7	18								
	2000	10	2,7	365	3	0,8	5	1,4	4	1,1	11	3,0
	3000	2	3,1	62	2	3,2	2	3,2	1	1,6	3	4,8
	4000	1	0,6	155	2	1,3	1	0,6	3	1,9	5	3,2
TB—7b	0	2	33,3	4					1	25,0		
	2000	5	41,7	7					2	28,6		
	3000			5								
	4000			1								
TB—8a	0	1	12,5	7								
	1000			12								
	2000	2	13,3	13	1	7,7			1	7,7		
	3000	1	20,0	4					1	25,0		
TB—9a	0	1	4,3	22					3	13,6		
	2000	3	4,5	64	2	3,1			4	6,2		
TB—9b	0	1	7,1	13					2	15,4		
TB—10	0	4	14,8	23					5	21,7		
	2000	2	15,4	11								
Totals:												
Control (0 kr)		23	6,3	341	2	0,6			24	7,0		
Treated (1—4 kr)		163	8,0	1877	48	2,5	26	1,4	56	3,0	43	2,3

the same meaningless with the '59 data (Table 8). The mentioned field conditions, different as they were in affecting germination and survival, do not suffice to account for the differential behavior: in fact, the severe selection occurred in 1960 should have caused a reductions in mutated genotypes, especially in the case of lethals, even though heterozygous.

Difficult to explain, on the contrary, is the behavior of the lethals class. Again, while the treated material of 1960 shows increasing effects with higher doses, the control of 1959 presents the highest frequency of lethals, and there is no regular trend in its treated classes.

Table 2. *Results obtained in crosses on A158 T (1959)*

Translocation	Treatment r	Ears with few seeds N	Ears with few seeds %	Ears with good seed setting	Endosperm mutations N	Endosperm mutations %	Seedling mutations N	Seedling mutations %	Lethals N	Lethals %	Semisterile ears N	Semisterile ears %
TB—1a	0	3	4,7	62			1	1,6	4	6,4		
	1000	1	1,6	63	1	1,6	1	1,6				
	2000	13	4,8	259	1	0,4	1	0,4	5	1,9	7	2,7
	3000	4	4,0	95	2	2,1			3	3,1	5	5,3
	4000	1	1,5	64	1	1,6			3	4,7	5	7,8
TB—1b	0			15					1	6,7		
	1000			32			1	3,1	1	3,1		
	2000	12	8,0	137	1	0,7			6	4,4	3	2,2
	3000	5	7,2	64					2	3,1	3	4,7
	4000	3	11,1	24							3	12,5
TB—3	0	37	23,6	120	18	15,0	1	0,8	3	2,5	1	0,8
	1000	9	5,0	169	23	13,6			4	2,4	2	1,2
	2000	116	22,9	391	12	3,1			7	1,8	5	1,3
	3000	7	4,4	153	11	7,2	1	0,6	5	3,3	13	8,5
	4000	13	7,0	173	9	5,2			5	2,9	13	7,5
TB—4a	2000			2								
TB—6a	0	4	3,0	131	3	2,3	4	3,0	5	3,8	1	0,8
	1000			128					4	3,1		
	2000	5	2,5	194	1	0,5	1	0,5			4	2,1
	3000			35							2	5,7
	4000	2	2,3	83	4	4,8	1	1,2	2	2,4	5	6,0
TB—7b	0			1								
	1000			1								
	2000			8					1	12,5		
	4000			4								
TB—8a	0	2	33,3	4								
	2000			2								
TB—9a	0	1	14,3	6								
	1000	2	10,5	17								
	2000	3	7,3	38					2	5,3	1	2,6
	3000	2	12,5	14			1	7,1				
	4000	1	6,2	15								
TB—9b	0	1	4,0	24			1	4,2				
	1000			7			1	14,3	2	28,6		
	2000	11	16,4	56	1	1,7					1	1,8
	3000	1	20,0	4			1	25,0				
	4000			8								
TB—10	0	4	40,0	6								
	1000	2	25,0	6					1	16,7		
	2000	10	26,3	28					3	10,7		
	3000	3	33,3	6					1	16,7		
	4000	3	25,0	9					1	11,1		
Totals:												
Control (0 kr)		52	12,3	369	21	5,7	7	1,9	13	3,5	2	0,5
Treated (1—4 kr)		229	9,1	2289	67	2,9	9	0,4	58	2,5	72	3,1

Besides the semisterile ears, whose physical basis is undoubtedly to be found in chromosomal aberrations—as mentioned—, and whose frequency is clearly related to radiation dose, special consideration deserve the classes of mutations affecting either endosperm or seedling. Both such classes are not significantly increased by the treatments (Table 6). This is in contrast with the fact that

Table 3. *Results obtained in crosses on WF 9 (1959)*

Translocation	Treatment r	Ears with few seeds		Ears with good seed setting	Endosperm mutations		Seedling mutations		Lethals		Semisterile ears	
		N	%		*N*	%	*N*	%	*N*	%	*N*	%
TB—1a	0	10	30,3	23					2	8,7		
	1000	7	7,8	83			2,0	2,4	6	7,2		
	2000	10	27,0	27	2	7,4			1	3,7		
	3000	3	10,7	25	4	16,0	0,5	2,0	3	12,0		
	4000	4	20,0	16	3	18,7			1	6,2		
TB—1b	0	1	20,0	4					1	25,0		
	1000	2	5,1	37			1,0	2,7	3	8,1		
	2000	4	10,0	36					1	2,8		
	3000	11	30,5	25			1,5	6,0	8	32,0		
TB—3	0	10	66,7	5								
	1000	11	13,6	70	2	2,8	2,0	2,8	1	1,4		
	2000	32	23,5	104	15	14,4			1	1,0		
	3000	6	5,9	95	5	5,3	4,5	4,7	12	12,6		
	4000	7	10,1	62	13	21,0			1	1,6		
TB—4a	0	4	36,4	7					1	14,3		
	1000	0		1								
	2000	1	16,7	5								
TB—6a	0	2	8,0	23					2	8,7		
	1000	2	8,3	22					1	4,5		
	2000	27	10,8	222	4	1,8	2,0	0,9	2	0,9	1	0,4
	3000	6	10,0	54	3	5,5	2,5	4,6	8	14,8		
	4000	3	7,7	36					1	2,8		
TB—7b	0	2	50,0	2								
	1000			3								
	2000	10	45,4	12	1	8,3						
	3000	2	44,0	3					1	33,0		
	4000			2								
TB—8a	0	16	21,0	60					4	6,6		
	2000	9	69,2	4					1	25,0		
	4000	5	62,5	3	1	33,3						
TB—9a	0	7	46,7	8								
	1000	2	6,7	28			1,0	3,6				
	2000	2	15,4	11			0,5	4,5				
	3000			1					1	100,0		
	4000			9								
TB—9b	0	2	25,0	6								
	1000	3	12,5	21					4	19,0	3	14,3
	2000	5	11,1	40					1	2,5		
	3000			5					1	20,0		
	4000	11	17,5	52					5	9,6	6	11,5
TB—10	0	21	51,2	20					1	5,0		
	1000	17	31,5	37			0,5	1,3	6	16,2		
	2000	26	42,6	35			1,0	2,8	4	11,4		
	2000	21	26,9	57			2,5	4,4	12	21,0		
	4000	35	49,3	36			1,0	2,8	1	2,8		
Totals:												
Control (0 kr)		75	32,2	158					11	7,0		
Treated (1—4 kr)		284	18,2	1279	53	4,1	22,5	1,7	87	6,8	10	0,8

these same classes of mutations have been found increased in the experiments in which the seed parent to be screened with the TB—A stocks was been obtained with treated pollen (Table 9).

Table 4. *Results obtained in crosses on WF9T (1959)*

Translocation	Treatment r	Ears with few seeds N	Ears with few seeds %	Ears with good seed setting	Endosperm mutations N	Endosperm mutations %	Seedling mutations N	Seedling mutations %	Lethals N	Lethals %	Semisterile ears N	Semisterile ears %
TB—1a	0	1	3,7	26					4	15,0		
	1000	4	8,0	46					3	6,5		
	2000	40	22,8	135			4	3,0	18	13,0	1	0,7
	3000	2	3,3	59					11	18,6		
	4000	12	15,8	64			2	3,1	2	3,1	2	3,1
TB—1b	0			50					12	24,0		
	1000			31					1	3,2		
	2000	24	29,6	57					12	21,0	1	1,7
	3000	1	3,6	27			1	3,7	5	18,5		
	4000	1	4,0	24					1	4,2		
TB—3	0	5	8,6	53					8	15,1		
	1000	45	24,4	139	1	0,72	4	2,9	14	10,1	1	0,7
	2000	56	15,9	296	2	0,68	3	1,0	49	16,5	4	1,3
	3000	6	11,3	47					6	12,8		
	4000	11	13,9	68			1	1,5	3	4,4	1	1,5
TB—4a	1000			4							1	25,0
	2000	2	50,0	2								
TB—6a	0			57					11	19,3		
	1000	1	1,2	85					6	7,0		
	2000	17	7,5	210	1	0,48	3	1,4	35	16,1	3	1,4
	3000	15	10,6	127	2	1,57	2	1,6	7	5,5	4	3,1
	4000	14	8,7	146			3	2,0	12	8,2	2	1,4
TB—7b	0	4	44,4	5					4	80,0		
	1000	1	20,0	4								
	2000	9	21,9	32					9	28,1		
	3000	1	11,1	8					2	25,0		
TB—8a	0	1	11,1	8					3	37,5		
	1000			12					1	8,3		
	2000	11	34,4	21			2	9,5	5	23,8		
	4000	3	25,0	9					3	33,3		
TB—9a	0	5	12,8	34			1	2,9	7	20,6		
	1000			25					3	12,0		
	2000	11	9,9	100			1	1,0	14	14,0	1	1,0
	3000	2	4,9	39					6	15,4		
	4000	1	14,3	6								
TB—9b	0	2	12,5	14					8	57,1		
	1000	1	4,0	24					1	4,2		
	2000	5	9,4	48					12	25,0		
	3000			15					2	13,3		
	4000			3								
TB—10	0	45	50,0	45	4	8,89			15	27,3		
	1000	1	9,1	10								
	2000	60	36,8	103	2	1,94	1	1,0	23	22,3	2	1,9
	3000	14	25,0	42			1	2,4	3	7,1		
	4000			4								
Totals:												
Control (0 kr)		63	17,3	302	4	1,32	1	0,3	72	23,8		
Treated (1—4 kr)		371	15,2	2072	8	0,39	28	1,3	269	13,0	23	1,1

Discussion

The efficiency of radiation in inducing chromosomal aberrations in maize is very well established under many so far adopted experimental conditions. It

Table 5. *Results obtained in crosses on A158T (1960)*

Translocation	Treatment r	Ears with few seeds N	Ears with few seeds %	Ears with good seed setting	Endosperm mutations N	Endosperm mutations %	Seedling mutations N	Seedling mutations %	Lethals N	Lethals %	Semisterile ears N	Semisterile ears %
TB—3	0	36	2,99	1168	23	1,97	11	0,94	31	2,65	9,0	0,77
	4000	54	5,09	1006	16	1,59	10	0,99	53	5,27	59,5	5,91
	8000	85	14,88	486	13	2,67	5	1,03	41	8,44	54,5	11,21
	16000	17	51,51	16	1	6,25			6	37,50	1,0	6,25
TB—4	0	1	1,02	97					34	35,05		
	4000	7	8,33	77					19	24,67	5,0	6,49
	8000	12	21,05	45					10	22,22	5,0	11,11
	16000	4	44,44	5					3	60,00		
TB—9b	0	8	3,02	257			1	0,39	19	7,39	3,0	1,17
	4000	33	14,86	189					7	3,70	11,0	5,82
	8000	24	22,42	83			1	1,20	9	10,84	5,5	6,63
	16000	1	20,00	4								
TB—10	0	3	7,89	35					7	20,00		
	4000	8	14,54	47					13	27,66	2,0	4,25
	8000	27	52,94	24					13	54,17		
	16000	4	50,00	4					2	50,00		

Table 6. *Comparison of treated and untreated material*

Material	Ears with few seeds N	Ears with few seeds %	Ears with good seed setting	Endosperm mutations N	Endosperm mutations %	Seedling mutations N	Seedling mutations %	Lethals N	Lethals %	Semisterile ears N	Semisterile ears %
1959:											
Control	213	15,40	1170	27	2,31	8,0	0,68	120	10,26	2,0	0,17
Treated	1050	12,25	7517	176	2,34	85,5	1,14	470	6,25	148,0	1,97
1960:											
Control	48	2,99	1556	23	1,48	12,0	0,77	91	5,85	12,0	0,77
Treated	276	12,20	1987	30	1,51	16,0	0,80	176	8,86	143,5	7,22
Totals:											
Control	261	8,74	2726	50	1,83	20,0	0,73	211	7,74	14,0	0,51
Treated	1326	12,13	9504	206	2,17	101,5	1,07	646	6,80	291,5	3,07
Fiducial[1], Limits: $P = 0.05$											
Control					1,36		0,45				
					2,41		1,11				
Treated					1,88		0,87				
					2,48		1,29				

[1] Calculated according Stevens' Tables (1942).

is, on the contrary, quite controversial whether also "gene" mutations, or at least mutations simulating those occurring under natural conditions, may be artificially produced in considerable amount both with ionizing radiations or by other means. Any contribution in elucidating such behavior then is of obvious importance both from a theoretical point of view as well as from a point of view of plant breeding.

It is well known that Stadler (1954), after about thirty years of experimental work, in maize genetics, was lead to conclude, on the basis of analyses challenging both the whole germplasm and specific loci, that mutations in this species appear of chromosomal nature. Other pertinent points have been recently discussed (Bianchi 1961).

Table 7. *Mutability in different chromosome arms of maize*

TB—A interchange	Ears with good seed setting	Endosperm mutations		Seedling mutations		Lethals		Total mutations		Expected mutation rate[1]
		N_1	%	N_2	%	N^3	%	$N_1+N_2+N_3$	%	
TB—1a	1353	15	1,11	14,5	1,07	85	6,3	114,5	8,5	5,34
TB—1b	777	1	0,13	5,5	0,71	54	6,9	60,5	7,8	5,00
TB—3	5546	203	3,66	56,5	1,02	280	5,0	539,5	9,7	5,50
TB—4	251					68	27,1	68,0	27,1	2,58
TB—6	2241	25	1,11	26,5	1,18	107	4,8	158,5	7,1	1,00
TB—7	102	1	0,98	0,0	0,00	20	19,6	21,0	20,6	2,74
TB—8	159	2	1,26	2,0	1,26	19	11,9	23,0	14,5	1,91
TB—9a	437	2	0,46	4,5	1,03	40	9,1	46,5	10,6	2,58
TB—9b	873	1	0,11	5,0	0,57	73	8,4	79,0	9,0	1,17
TB—10	598	6	1,00	7,0	1,17	111	18,6	124,0	20,7	2,58

[1] The value is calculated making equal to 1 the shortest chromosome segment (see also Fig. 1 and under the paragraph "The behavior of B chromosome interchanges").

Table 8. *Response of the different treatments*

Treatment	Ears with few seeds		Ears with good seed setting	Endosperm mutations		Seedling mutations		Lethals		Semisterile ears	
	N	%		N	%	N	%	N	%	N	%
1959:											
0 kr	213	15,40	1170	27	2,31	8,0	0,68	120	10,26	2,0	0,17
1 kr	145	9,54	1374	31	2,26	16,5	1,20	67	4,88	8,0	0,58
2 kr	580	13,88	3598	76	2,11	35,5	0,98	242	6,72	61,0	1,69
3 kr	189	13,03	1261	30	2,38	23,5	1,86	110	8,72	37,0	2,93
4 kr	136	9,57	1284	39	3,04	10,0	0,78	51	3,97	42,0	3,27
1960:											
0 kr	48	2,99	1556	23	1,48	12,0	0,77	91	5,85	12,0	0,77
4 kr	102	7,17	1320	16	1,21	10,0	0,76	92	6,97	77,5	5,87
8 kr	148	18,82	638	13	2,04	6,0	0,94	73	11,44	65,0	10,19
16 kr	26	47,27	29	1	3,45			11	37,93	1,0	3,45

Table 9. *Results in crosses in which the seed parent was grown from seed obtained with fertilization of X-rayed pollen*

TB—A interchange	Treatment	Ears with few seeds		Ears with good seed setting	Endosperm mutations		Seedling mutations		Lethals		Semisterile ears	
		N	%		N	%	N	%	N	%	N	%
TB—3	None	17	4,67	357	1	0,28	6	1,68	34	9,52	0,5	0,14
	1,2 kr	33	14,02	238	14	5,88	9	3,78	48	20,17	1,0	0,42
TB—4	1,2 kr	5	23,80	16	1	6,25	0	0,00				
Total	None	17	4,67	357	1	0,28	6	1,68	34	9,52	0,5	0,14
	1,2 kr	38	13,01	254	15	5,90	9	3,54	49	19,29	1,0	0,39
Fiducial limits[1] $P=0.05$												
None						0,01		0,62		6,69		
						1,56		3,61		13,07		
1,2 kr						2,96		1,63		14,75		
						9,56		6,61		24,65		

[1] Calculated according STEVENS' Tables (1942).

The results presented in this paper obtained with a cytogenetical approach which screens several well definite but sufficiently large chromatin segments,

confirm this interpretation. Chromosomal aberrations are detectable in our treated material with frequency more than proportional to the r-doses, with the exception of the highest dose, likely in connection with a saturating effect—not to

Fig. 6

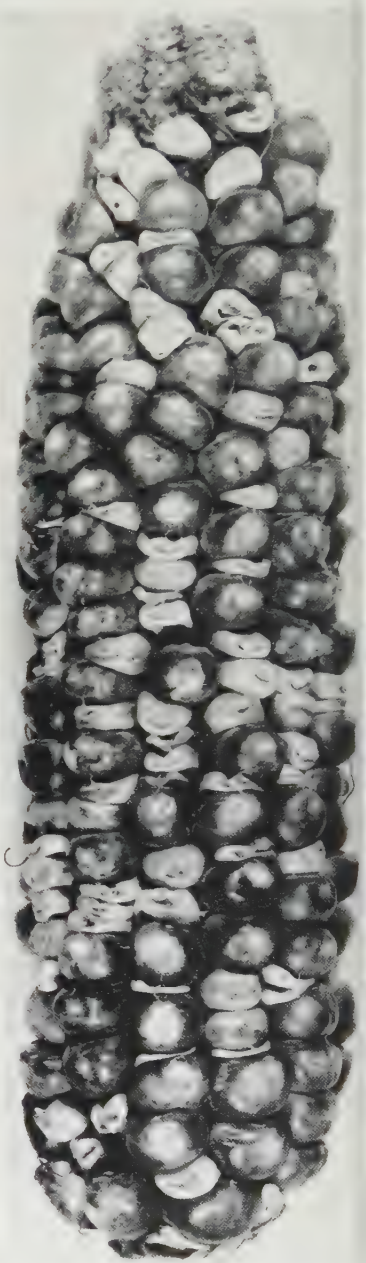


Fig. 7

Fig. 6. Ears from the cross $I/C \times$ TB—3. Since the pollen possessing the color inhibitor (I) has been X-rayed, such I factor must have been inactivated or deleted to give rise to the plant that bore the right ear

Fig. 7. Ear of A158T $\times$ TB—3. The distinction of the defective seeds from the normal ones is clear-cut: since their percentage is about 50, the mutant factors must have been induced in homozygous conditions; it is the only case registered out of more than 14000 scored ears

mention, in such case, the limited size of the sample—as suggested also by the limited germination of seed and survival of the sprouted plants. Incidentally, as appears from Table 5, as well as from the preceeding ones with obvious calculations, it is clear that doses not exceeding 4 kr do not affect significantly germination and survival. It may be noted, furthermore, that (Tables 1—4) while there is no difference in the response of normal and *T* cytoplasm as to frequency of semisterile ears, A158 shows higher incidence of semisterility than WF9: since, as mentioned, semisterile ears have been considered only among well filled ears, it may well be that such difference is actually spurious, due to the characteristic kernel density in WF9 ears (Figs. 2 and 3), which may have played a part in applying rigorously our classification criterion. However, even if a real difference could be proven to exist between A158 and WF9 under this respect, it should have no great bearing on the main points of our conclusions; the same holds for the differential germination and survival of plants derived from the heaviest treatments. It is conceivable that, besides the chromosome rearrangements giving rise to semisterility, other minor alterations, whatever their nature may be, should be produced in maize genetic material, alterations that should deal with endosperm and plant characters. This has not been the case, at a significant extent, when the seed has been treated. The explanation is likely to be in what Gaul (1960) has clearly indicated for barley as well as in the mentioned nature of induced mutations in maize. When mutagens are applied to seed, they are actually affecting the embryo in which a great number of cells are present. According to findings of several authors, and recently also on basis of cytogenetical data, by Stein and Steffensen (1959), in the maize embryo the first 5—6 leaves are already present as individualized structures, the following 2—3 leaves are present as part of the meristematic capital; while the later ones are formed by the few apical cells. Since the reproductive structures are originated obviously also from these apical cells, they become formed following a great number of mitoses occurring during and after germination. Such highly meristematic tissues may be considered a cells population among which a competition may start, once radiation or other mutagenic agents have established a heterogeneity in their genetical material. This behavior detailedly described by Gaul in barley and by him called "diplontic selection" on the basis of several genetic data was, to some extent, already indicated by Stadler since 1930. The use of *TB—A* technique besides other advantages (analysis of F_1 instead of later germinations; location of the mutants; avoiding of transmission through male gametophyte which seriously can hinder it in cases of many mutants) actually tends to minimize the possible effects of diplontic selection since it suffices that the mutant cell lineage reach the ear, and offers to hundred of loci a chance to produce mutants of prompt detection. In spite of similar conditions the attempt to increase significantly the mutations affecting endosperm and seedling traits has been largely unsuccessful. This is interpreted as a consequence of severe diplontic selection. Since the induced mutations are obviously in the greatest majority heterozygous, our results confirm the Stadler's view (1932) that they are chiefly deficiencies: in fact, it is difficult to admit that cells heterozygous for "gene" mutations can be so strongly selected against, when rearrangements as reciprocal translocations (responsible to a great extent in producing semisterility) are

induced and transmitted and when the fact is considered that in maize populations the proportion of heterozygous for "gene" mutations is paramount. Confirm of this view comes from Table 9: where mutations are produced in the sperm nuclei by pollen treatment, practically the whole generated embryo possesses an induced alteration: when the plants grown from such embryos are screened for the corresponding mutation classes, these appear then increased; and it is of critical importance the fact that is highly significant, besides to be conspicuous, the increase of endosperm mutations, while is just doubled the rate of seedling mutations. It is known that a deficiency giving a defective endosperm, may well result in a lethal condition for the germ: in fact in this experiment the lethal class of the treated material is significantly doubled as compared with the control. Also this, therefore, points to a chromosomal nature of these induced mutations.

Under this respect the data of Table 7 may also be considered, which indicate that frequency of recovered mutations from the different chromosome segments are not correlated to their size. This holds both taking into account only endosperm and seedling mutations or the same together with the lethals. It appears difficult to agree this finding with the existence of a "gene string" showing "genic" mutations: the same finding, on the contrary, is understandable, once the assumption is made that the different chromosome segments possess a different importance in the nuclear economy (and consequently chromosome aberrations are met whith different fate according the specific regions involved): which is now clearly well established, at least for endosperm development (Bianchi, Bellini, Contin, Ottaviano, unpubl.).

Acknowledgement. The authors are greatly grateful to Comitato Nazionale Energia Nucleare, Roma, for the financial support of this work. Thanks are also due to Drs. A. Morandi, G. Marenco and M. Pozzi, of Plant Genetics Institute of Catholic University, Piacenza, for their help in field pollinations and scoring work for kernel and seedling traits. Field and some minor expenses have been paid with the funds granted to Prof. A. Bianchi by the International Atomic Energy Agency, Vienna, under Contract 64/US, which is also gratefully acknowledged.

Summary

Seeds of maize inbred lines A158, A158T, WF9 and WF9T (T = Texas factor for male sterility), whose water content was ranging from 12 to 7%, were X-rayed with 1–2–3–4–8–16 kr. Plants grown from them were crossed with TB—A stocks, possessing chromosomal interchanges between A and B chromosomes. These, because of non disjunction of their B^A chromosomes in the microspore second mitosis, lead in F_1 ears to the production of hypoploid endosperm and embryo, in high percentage. Consequently, any mutation which has occurred in the corresponding segment of a normal or treated chromosome, being hemizygous, will be expressed on the F_1 ears or seedlings. The A chromatin segments involved in the B^A chromosomes were estimated to possess from about 100 "genes" to more then 600, according their size.

About 4000 control and 10000 ears from treated material were examined in 1959 and 1960 crops. While the number of ears showing poor seed setting or lethal factors was correlated with the r doses only in 1960 crop, the chromosomal aberrations turned out always clearly increasing with the r doses. Consequently the mutagenic efficiency of the treatments is unquestionable, not to

consider obvious "physiological" response, as germination and survival, clearly and proportionatedly affected by radiation, at least in 1960 with heavier treatments.

On the contrary endosperm and seedlings mutations were not significantly increased by any treatment. Since the changes of detecting similar events with the adopted methods should be very high, as proved by the relatively very high mutation rate in the control, these findings strongly suggest that the induced mutations are chiefly chromosomal aberrations, which, if rearrangements, may be recognized on the basis of the consequent partial (and transmissible) sterility, if deficiencies, they may be eliminated during plant development by means of diplontic (somatic) selection.

These results confirm the chromosomal nature of the greatest majority of artificially induced mutations in maize, obtainable under the so far selected experimental conditions.

The detectable rate mutation, both "spontaneous" and X-rays induced does not seem to be correlated to the size of the chromatin segments analyzed. This also appears difficult to agree with a "genic" interpretation of mutation in maize.

References

Bianchi, A.: Mitotic disjunction and non-disjunction in the case of interchanges involving B-type chromosome. Maize Gen. Coop., News Letter **31**, 41—42 (1957).

— Le traslocazioni fra cromosomi A e B nel mais: loro uso per lo studio della mutabilità. Genetica agraria **12**, 337—354 (1960).

— Aspetti della mutagenesi nel mais e rapporti con problemi generali della mutazione. Atti A.G.I. **6** (1961).

— G. Bellini, M. Contin and E. Ottaviano: Non-disjunction in presence of interchanges involving B-type chromosome in maize and some phenotypical consequences of meaning in maize breeding. (Unpubl.)

Gaul, H.: Critical analysis of the methods for determining the mutation frequency after seed treatment with mutagens. Genetica agraria **12**, 297—318 (1960).

Laughnan, J. R., and E. H. Coe: A–B interchanges as a method of screening for new mutants in specific segments. Maize Gen. Coop., News Letter **27**, 55—56 (1953).

Roman, H.: Mitotic non disjunction in the case of interchanges involving the B-type chromosome in maize. Genetics **32**, 391—409 (1947).

— Directed fertilization in maize. Proc. nat. Acad Sci. (Wash.) **32**, 36—42 (1948).

—, and A. J. Ullstrup: The use of A—B translocations to locate genes in maize. Agron. J. **43**, 450—454 (1951).

Stadler, L. J.: Some genetic effects of X-rays in plants. J. Hered. **21**, 3—19 (1930).

— The experimental modification of heredity in crop plants. I. Induced chromosomal irregularities. Sci. Agric. **11**, 557—572 (1931).

— The gene. Science **120**, 811—819 (1954).

Stevens, W. L.: Accuracy of mutation rates. J. Genet. **43**, 301—307 (1942).

Professor Dr. A. Bianchi,
Università di Milano, Istituto di Genetica, Milano (Italy), Via Celoria 10

Zeitschrift für Vererbungslehre 92, 100—118 (1961)

Department of Biology, Brookhaven National Laboratory,
Upton, Long Island, New York

GENETIC CONTROL AND RADIATION EFFECTS IN *NICOTIANA* TUMORS*

By

HAROLD H. SMITH and HARLAN Q. STEVENSON

With 4 Figures in the Text

(Received March 25, 1961)

Genetic tumors are neoplastic growths that arise, without any apparent external cause, in organisms of certain particular genotypes. The genetic constitution of the organism seemingly determines the potentiality of the constituent cells to undergo spontaneous change from normal growth, with respect both to rate and differentiation, to abnormal, relatively undifferentiated proliferation.

Evidence for genetic control of tumor formation in *Nicotiana* has been obtained from three principal observations, namely, (1) tumors are confined to plants of particular interspecific hybrid combinations, (2) reciprocal crosses give hybrids showing the same tumor expression, (3) tumors fail to form when only certain chromosomes are present in an interspecific combination which with the full complements of chromosomes regularly forms tumors (KEHR and SMITH 1954). One purpose of the present paper is to present evidence of segregation and linkage for the tumorous condition, thus providing further confirmation of genetic control. A second objective is to report different effects of irradiation on a variety of hereditary tumor types in order to demonstrate interrelationships between genotype and radiation response in tumor formation.

Materials and Methods

The following species and interspecific combinations of *Nicotiana* were used in these experiments.

1. Species
   - *N. suaveolens* (SuSu, 2n = 32)
   - *N. glauca* (GG, 2n = 24)
   - *N. langsdorffii* (LL, 2n = 18)
   - *N. sanderae* var. Sutton's Scarlet (SS, 2n = 18)
2. Amphidiploids
   - *N. suaveolens-langsdorffii* (SuSuLL, 2n = 50)
   - *N. glauca-langsdorffii* (GGLL, 2n = 42)
   - *N. suaveolens-glauca* (SuSuGG, 2n = 56)
3. Amphidiploids × species and hybrids

N. suaveolens-langsdorffii × *N. langsdorffii*, *N. glauca*, *N. sanderae*, and F_1 *N. langsdorffii* × *N. sanderae*.

N. glauca-langsdorffii × *N. sanderae*, and F_1 *N. langsdorffii* × *N. sanderae*.

N. suaveolens-glauca × *N. langsdorffii*, *N. sanderae*, and F_1 *N. langsdorffii* × *N. sanderae*.

* Research carried out at Brookhaven National Laboratory under the auspices of the U. S. Atomic Energy Commission. Present address: HARLAN Q. STEVENSON, Department of Botany, University of Florida, Gainesville, Florida. Appreciation for cytological observations reported is expressed to BERTHA KUGELMAN.

4. Crosses with introgressive hybrids of *N. langsdorffii* and *N. sanderae* (Smith 1937a).

N. langsdorffii (with genes *P*, *R*, $I_1 I_2$, *E*, *g*, and $b_1 b_2$ introgressed, fourth backcross, from *N. sanderae*) crossed with *N. suaveolens*, *N. glauca*, *N. suaveolens-langsdorffii*, *N. glauca-langsdorffii*, and *N. suaveolens-glauca*.

N. sanderae (with genes *p*, *r*, $i_1 i_2$, *e*, *G*, and $B_1 B_2$ introgressed, sixth backcross, from *N. langsdorffii*) crossed with *N. suaveolens*, *N. glauca*, *N. suaveolens-langsdorffii*, *N. glauca-langsdorffii*, and *N. suaveolens-glauca*.

5. Radiation-induced nontumor forming amphidiploid *N. glauca-langsdorffii* (Izard 1957) crossed with *N. glauca-langsdorffii*, F_1 *N. langsdorffii* × *N. sanderae*, introgressive hybrids of *N. langsdorffii* and *N. sanderae*.

Fig. 1. Examples of quantitative scoring of categories of tumor expression showing, from left to right Class *0*, *1*, *2*, *3* and *4*

Primary incentives for making this rather extensive series of hybridizations stemmed from the following observations: (a) *N. langsdorffii* is known to initiate tumors in combination with genomes of *N. glauca* (Kostoff 1930) or *N. suaveolens* (Kostoff 1943). (b) Addition of a genome of *N. sanderae* to either of these combinations suppresses aerial tumor formation (Smith 1958). (c) Limited evidence of segregation for growth anomalies was reported for the cross *N. glauca* × (F_1 *N. langsdorffii* × *N. sanderae*) (Brieger and Forster 1942) and somewhat similar hybrids with *N. suaveolens* (Smith 1958). (d) Genetic studies with Izard's radiation-induced nontumorous amphidiploid *N. glauca-langsdorffii* (Izard 1957) have not been reported.

The experimental plants were grown in the greenhouse, control field, and in a cobalt-60 gamma irradiation field during 1958, 1959 and 1960. Plants were transplanted to the field in early June and observations on tumor formation were made toward the end of the growing season from late August to early October, on an average 108 days after transplanting. Stem cuttings of some field plants were made and maintained in the greenhouse or transplanted to the field for a second growing season.

For scoring purposes aerial tumor expression was classified as:

0 — no tumors.

1 — small, infrequent tumors; mainly in inflorescence.

2 — moderate number of tumors; at least one of which is as large as $^1/_2$ inch in diameter.

3 — frequent tumors; many of them large (typical of *N. glauca-langsdorffii*).

4 — plant covered with tumors, ranging from most extreme expression found on *N. suaveolens-langsdorffii* to some even more tumorous.

These categories are arbitrary but definitely reflect different degrees of tumorization (as shown in Fig. 1). Some plants did not form any true tumors but showed anomalies of

growth as small nodal swellings in the inflorescence, "witches broom" type growth, or abnormal swollen stems. These were considered to be basically nontumorous and were scored as "−1", that is, between "0" and "1". The roots of plants were examined in a few instances, but not regularly. This additional observation might well be helpful in further experiments since a number of *Nicotiana* interspecific hybrids may form tumors on the roots only (KEHR and SMITH 1954).

Results

Genetic Observations

Genetic experiments with tumor-forming hybrids of *Nicotiana* are restricted by the fact that tumors are produced only in combinations of species that are distantly related and hence form sterile hybrids. The distinctly different effect on tumorization of genomes of the closely related *N. langsdorffii* and *N. sanderae* (when combined with other appropriate species) affords an opportunity for more extensive genetic analysis.

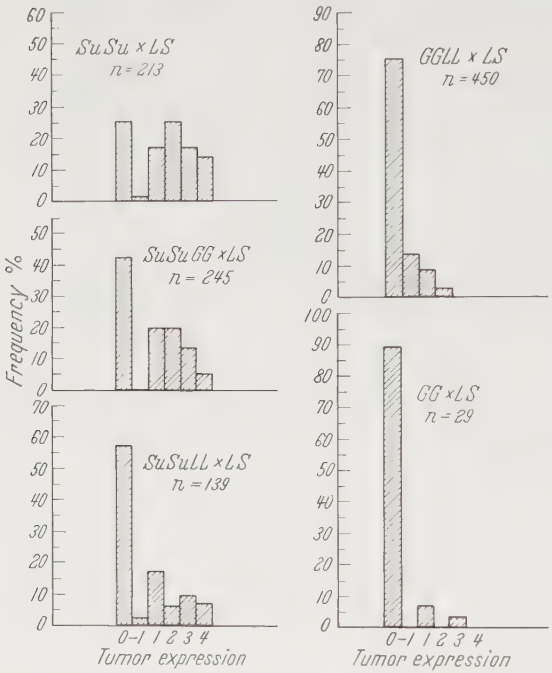


Fig. 2. Frequency distribution of classes of tumor expression in cultures derived by crossing the F_1 hybrid *N. langsdorffii* × *N. sanderae* (*LS*) onto five different genotypic backgrounds: *N. suaveolens* (*SuSu*), *N. suaveolens-glauca* (*SuSuGG*), *N. suaveolens-langsdorffii* (*SuSuLL*), *N. glauca-langsdorffii* (*GGLL*) and *N. glauca* (*GG*)

Segregation and recombination of components of the *N. langsdorffii* and *N. sanderae* genome in F_1 gametes would be expected to result in a variety of tumorous types when combined with certain specific genomes as, e.g., *N. glauca* or *N. suaveolens*. The results of crossing F_1 *N. langsdorffii* × *N. sanderae* with *N. suaveolens*, *N. suaveolens-glauca*, *N. suaveolens-langsdorffii*, *N. glauca-langsdorffii* and *N. glauca* are shown in Fig. 2. The evidence for segregation in tumor expression is clear.

No attempt at a factorial genetic analysis has been made. The segregation pattern indicates multifactorial or polygenic control.

Neither *N. suaveolens*, *N. glauca*, nor the amphidiploid *N. suaveolens-glauca* alone forms tumors. Tumorous segregants in crosses of these with F_1 *N. langsdorffii* × *N. sanderae* would appear to result largely from the influence of genes from *N. langsdorffii* since this species forms highly tumorous (Class 3 and 4) hybrids with *N. glauca* and *N. suaveolens*. *N. sanderae*, on the other hand, in combination with these species, forms only root or stem base tumors or gives a variable weak response (BRIEGER and FORSTER 1942, KEHR and SMITH 1954; NÄF 1959). In certain combinations it definitely suppresses aerial tumor formation (SMITH 1958). The amphidiploids *N. glauca-langsdorffii* and *N. suaveolens-*

langsdorffii are highly tumorous (Class 3 and 4) so that the segregation observed on these two backgrounds (Fig. 2) is considered to reflect that of tumor inhibiting genes from *N. sanderae*. Inhibition was complete (Class 0) in the above ground plant parts in a high proportion of the segregants.

This result is in line with the previously reported finding that a full genome of *N. sanderae*, when added by hybridization to *N. suaveolens-langsdorffii*, inhibits aerial tumor formation (Smith 1958). Further evidence of the tumor-inhibiting effect of hereditary factors from *N. sanderae* is presented in Table 1. *N. sanderae*, *N. langsdorffii*, and two kinds of introgressive hybrids involving these species were used to pollinate *N. suaveolens*, *N. suaveolens-langsdorffii*, and *N. glauca-langsdorffii*. One type of introgressive hybrid parent was produced by backcrossing the F_1 *N. langsdorffii* × *N. sanderae* to *N. langsdorffii* four times accompanied by selection for the *N. sanderae* genes *P*, *R*, I_1I_2, *E*, *g*, and b_1b_2 (Smith 1937a). This gives a line with intense red flowers (PRI_1I_2E), lacking chlorophyll pigmentation (*g*), and with white pollen (b_1b_2).

Table 1. *Percentage of plants showing aerial tumors by the end of the growing season in progenies of certain Nicotiana hybrids*

♂ Parent	♀ Parent					
	N. suaveolens		*N. suav.-langs.*		*N. glauca-langs.*	
	n	Tumorous %	*n*	Tumorous %	*n*	Tumorous %
N. langsdorffii	[1]	100	244	100	[2]	100
N. langs. introgressed with marker genes from *N. sand.*	266	92	644	100	251[3]	37
N. sand. introgressed with marker genes from *N. langs.*	57	10[4]	59	55[4]	632	1
N. sanderae	8	[5]	60	0	54	0

[1] Reported by Kostoff 1943.

[2] Reported by Kehr and Smith 1954.

[3] Approximately 35% of the nontumorous plants have small nodal swellings in the inflorescence.

[4] The tumors are usually highly differentiated, teratomatous growths.

[5] Results are variable: occasional "witches broom" in upper branches and rare tumor on stem only at ground line; profuse branching, sparse flowering.

The significance of this introgressant is that its genotype is preponderantly that of *N. langsdorffii* except for certain small sectors of the chromosome complement marked by genes from *N. sanderae*. The second kind of introgressive hybrid parent was produced by backcrossing the F_1 *N. langsdorffii* × *N. sanderae* to *N. sanderae* six times accompanied by selection for *N. langsdorffii* genes p, r, i_1i_2, e, G, B_1B_2. This gives types without anthocyanin pigmentation (p) or purple anthocyanin (r), of very light intensity (i_1i_2) and restricted pigment extension (e), having chlorophyll in the flower (G), and with blue pollen (B_1B_2). The significance of this group of introgressants is that they are preponderantly of *N. sanderae* genotype except for certain small sectors of the chromosomal complement marked by genes of *N. langsdorffii*.

The results in Table 1 show that with increasing amounts of *N. sanderae* germplasm present, progressively fewer tumorous plants are produced in crosses

onto the tumorous amphidiploids *N. suaveolens-langsdorffii* and *N. glauca-langsdorffii*. The result cannot be considered as due to loss of tumor-initiating *N. langsdorffii* genes since all these progenies possess at least a full genome received from the female amphidiploid parent. The inhibitory effect of *N. sanderae* germplasm associated with the eight marker genes is clearly shown on the *N. glauca-langsdorffii* background by a reduction from 100 per cent to 37 per cent tumorous progeny. This infiltration of *N. sanderae* genes was insufficient to inhibit tumor formation on the *N. suaveolens-langsdorffii* background. The infiltration of the corresponding *langsdorffii* genes into *N. sanderae* resulted in no appreciable effect

Fig. 3a—c. Different types of tumors that occur in segregants of the cross *N. suaveolens* × (*N. langsdorffii* × *N. sanderae*). a Encrustations along entire stem. b Highly differentiated teratomata. c Relatively undifferentiated tumors

on tumor initiation in crosses with *N. glauca-langsdorffii*, i.e., the 1 per cent tumorous progeny obtained are comparable to crosses with pure *N. sanderae* (Table 1, last line). In the hybrid with *N. suaveolens-langsdorffii* the introgressed *langsdorffii* genes did influence tumor formation (55 per cent tumorous).

Crosses of the same types with *N. suaveolens* (Table 1) give the same essential results, i.e., increasing tumor inhibition (100, 92, 10, and 0 per cent tumors) with an increasing proportion of *N. sanderae* genes. In the hybrids with the introgressive types it is possible that the reduction in tumors is due to loss of *N. langsdorffii* genes rather than accumulation of tumor inhibiting genes from *N. sanderae*. This possibility cannot be dismissed as it was above for the amphidiploid crosses.

It should be noted that not only is there segregation for presence or absence of tumor and different quantitative degrees of tumorization, but there are striking differences in amount of differentiation in the tumors themselves. This is clearly controlled by the genotype. The range is from plants with highly differentiated teratomata to apparently fully undifferentiated growths (Fig. 3). Some combinations involving particularly *N. suaveolens* and *N. sanderae* tend to form more

differentiated abnormal growths, to branch profusely, and to flower sparsely. Certain other hybrid segregants form encrustations of tumorous tissue over large areas of the stem. This ubiquitous eruption of tumors, characteristic of and consequently controlled by particular genotypes, would seem to argue against wounding or other external stimuli as prerequisite to tumor initiation (Braun and Stonier 1958).

The inheritance of the difference in corolla size between *N. langsdorffii* (small flower) and *N. sanderae* (large flower) has been shown to be governed by what is considered to be a typical polygenic system (Smith 1937 b, Smith and Robson 1959). In hybrids and extra-chromosomal types involving these species, flower size is a sensitive criterion of the relative amount of germplasm from each parent species (Smith 1943). It is proposed that tumor formation is controlled in inheritance by genes which act in an appropriate genetic milieu so that those from *N. langsdorffii* lead to tumor initiation, those from *N. sanderae* to suppression of aerial tumors. If this hypothesis is correct, segregants with larger flowers (more *sanderae*-like) would be associated, on an appropriate genetic background, with relative lack of tumors, small-flowered segregants (more *langsdorffii*-like) with more pronounced manifestation of tumors.

Data relevant to this point were obtained by measuring total corolla length in segregants of the three crosses *N. suaveolens*, *N. suaveolens-glauca*, and *N. suaveolens-langsdorffii* pollinated with the F_1 *N. langsdorffii* × *N. sanderae*. Of the plants that flowered, only those surviving until late in the season and unequivocally scorable for tumors or lack of tumors were used. Each of the three populations was divided, on the basis of corolla size, into $^1/_4$ with the smallest, $^1/_2$ with intermediate, and $^1/_4$ with the largest corollas. The two extreme corolla size groups were then arranged in 2 × 2 tables, as shown combined in Table 2, according to whether or not the plants had aerial tumors.

Table 2. *Association between N. langsdorffii-like segregants (small corolla) and tumors, N. sanderae-like segregants (large corolla) and lack of tumors in crosses with the F_1 N. langsdorffii × N. sanderae (LS)*

Tumor Expression	Corolla Size					
	N. suaveolens × *LS*		*N. suav · glauca* × *LS*		*N. suav · langs.* × *LS*	
	Smallest	Largest	Smallest	Largest	Smallest	Largest
No tumors	9	32	6	22	20	28
Tumors	44	17	29	13	28	20

$$\bar{d}/\text{S.E.} = \frac{36.28}{6.03} = 6.02 \quad P < 0.001$$

As an alternative to the χ^2 test, the results were analyzed according to Cochran's (1954) method for a combined test of 2 × 2 contingency tables. The results (Table 2) show that the weighted mean difference ($\bar{d}$) is 6.02 times greater than the standard error. The probability that this is due to chance is less than 0.001. It was concluded, therefore, that there is a strong association of small flower size with tumors, large flower size with lack of tumors. This association could reflect either genetic linkage or the pleiotropic effect of a basic physiological condition controlling both flower size and tumor formation. Linkage is the favored

interpretation because the association is not complete and the large flowered *N. sanderae*, like *N. alata* (NAGEL 1939), has greater ability to respond through cell elongation to added auxins than has *N. langsdorffii*. Since tumorous combinations produce greater than normal amounts of auxin (KEHR and SMITH 1954) pleiotropism might be expected to strengthen the association between larger flowers and tumor formation; whereas the reverse association, expected with linkage, is found.

IZARD (1957) reported the induction, by X-raying seed, of a nontumotous mutant of the amphidiploid *N. glauca-langsdorffii*. Seed of IZARD's mutant (Linie 354, Ref. C561 × 13[35]) was made available to us through the kindness of Dr. A. E. KEHR. Reciprocal F_1's, F_2's, and backcrosses to both the regular tumorous (T) and mutant nontumorous (NT) forms of *N. glauca-langsdorffii* were made. The results are shown in Table 3. No tumors were found in any F_1 plants, showing that the nontumorous condition is dominant. Backcrosses of the F_1's to the nontumorous parent give no tumorous plants and backcrosses to the

Table 3. *Expression of tumor formation in generations derived from hybridization between a tumorous (T) and a radiation-induced, nontumorous (NT) line of Nicotiana glauca-langsdorffii amphidiploid*

Generation	Type	*n*	Tumor Expression		
			0 %	1 %	2—3—4 %
P_1	T	209	0	0	100
	NT	126	100	0	0
F_1	T × NT	28	100	0	0
	NT × T	15	100	0	0
F_2	(T × NT) and (NT × T) selfed	299	92.3	7.0	0.7
B_1	(T × NT) × T and Reciprocal	268	55.2	39.2	5.6
	(NT × T) × T and Reciprocal	73	52.0	41.1	6.8
	(T × NT) × NT and Reciprocal	271	100	0	0
	(NT × T) × NT and Reciprocal	317	100	0	0
× N. langs.	T × LL	86	0	0	100
	NT × LL	94	100	0	0

tumorous parent give approximately $^1/_2$ tumorous to $^1/_2$ nontumorous, indicating what may possibly be a simple dominant genetic basis for the mutant nontumorous condition. However, the F_2 populations comprised over 90 per cent nontumorous plants by the end of the growing season so that the validity of a single dominant gene interpretation is questionable. In backcrosses to *N. langsdorffii* the tumorous amphidiploid gives all tumorous progeny; the nontumorous mutant gives all nontumorous progeny.

Cytological observations (Table 4) were made on the two amphidiploids and the F_1 hybrid (T × NT) between them. All three forms have 42 chromosomes. The two amphidiploids have a high percentage of normal cells at metaphase and quartet stage, and produce between 85 and 90 per cent stainable pollen grains. Both have an appreciable number of lagging chromosomes or bridges at anaphase I; however, probably because of the extra set of chromosomes in these amphidiploids, they form mostly functional pollen. The F_1 hybrid is notably more irregular in meiosis than the parent amphidiploids but, nevertheless, produces over 80 per cent stainable pollen grains. The departures from normality

in F_1 meiosis may be due to structural chromosomal differences: (1) caused by irradiation of the nontumorous mutant parent; or (2) inherent in the chromosomal complements of the two amphidiploid parent lines which originated from different sources of the diploid species.

Table 4. *Cytological observations on meiosis and pollen of N. glauca-langsdorffii tumorous (GGLL-T), N. glauca-langsdorffii nontumorous mutant type (GGLL-NT), and F_1 N. glauca-langsdorffii tumorous × nontumorous (GGLL-T × NT)*

	GGLL-T ($2n = 42$)	GGLL-NT ($2n = 42$)	GGLL-T × NT ($2n = 42$)
Metaphase I			
Normal	453	452	260
1 univalent	45	40	161
2 univalents	2	8	70
3 univalents			8
4 univalents			1
Total	500	500	500
% normal	90.6	90.4	52.0
Anaphase I			
Normal	408	384	217
1 laggard	91	40	144
2 laggards	24	13	61
3 laggards			22
1 bridge	36	24	16
2 bridges	38	25	18
Bridge + fragment	3		23
Total	600	486	501
% normal	68.0	79.0	43.3
Quartet stage			
Quartet	586	464	366
+ 1 micronucleus	14	35	108
+ 2 micronuclei		1	21
+ 3 micronuclei			3
+ 4 micronuclei			2
Total	600	500	500
% normal	97.7	92.8	73.2
Pollen			
Normal	437	444	408
Empty	63	56	92
Total	500	500	500
% normal	87.4	88.8	81.6

Nontumorous *N. glauca-langsdorffii* was crossed with F_1 *N. langsdorffii* × *N. sanderae*, *N. langsdorffii* introgressed with marker genes from *N. sanderae*, and *N. sanderae* introgressed with marker genes from *N. langsdorffii*. No tumors were observed on any of the plants resulting from the above hybridizations, whereas tumorous plants were found in each of these crosses when the tumorous *N. glauca-langsdorffii* was used as a parent (Fig. 2, Table 1).

Reciprocal grafts of GGLL-T scion onto GGLL-NT stock and GGLL-NT scion onto GGLL-T stock were made. Tumor production was determined exclusively by the genotype of the tissue source. There was no evidence of a tumor-inducing effect crossing the graft union. Some of the grafted plants were observed over a two year period and tumor expression in stock and scion remained distinct.

It was of interest to note that GGLL-NT was less radioresistant than GGLL-T as shown by a greater reduction in plant height and higher lethality at radiation doses above 200 r/day.

Effects of Irradiation

In order to investigate the effects of irradiation on tumor formation the *Nicotiana* types being studied were grown during the summers of 1958, 1959 and 1960 under chronic γ-radiation from a Co^{60} source. Seedlings and cuttings were transplanted into the unirradiated control field and the γ-field from June sixteenth to twenty-fourth. Final scoring of tumors was made between October

fifth and seventh, so that the plants were exposed to γ-radiation for approximately 108 days during each of the seasons. The dosage levels employed were from 5 to 450 r per 20-hour day. Between these limits plants were grown at the following γ-radiation dosages: 10, 15, 25, 35, 50, 75, 100, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, and 400 r per 20-hour day.

For the most part, two to six cuttings of a clone or seedlings of a nonsegregating line were exposed at each dosage level. Results were usually sufficiently consistent among plants of the same genotype to warrant generalized conclusions regarding genotypic response at the various radiation levels.

Experimental evidence with excised tissues (KEHR and SMITH 1954) shows that conversion from normal cells to tumor cells can occur in small isolated stem fragments, so that the radiation experiments reported here can be considered as exposure of masses of cells, any of which, in appropriate tissues, is capable of giving rise to tumorous growth. This capability, combined with the characteristic of these plants for essentially continuous new growth, provides an impressively large population of cells as the significant target for exposure to radiation and for study of response.

The effect of radiation on tumor formation is summarized in Table 5 for the four species and various F_1, amphidiploid, and three species combinations. The species and their nontumorous combinations (LS, SuSuGG, and SuGS) all remain

Table 5. *Effect of chronic gamma irradiation at dosage levels up to 450 r per 20-hour day for approximately 108 days on various species, amphidiploids and hybrid combinations of Nicotiana*

Nicotiana Type	Symbol	γ Dosage in r per 20-hour day					
		0	100	200	300	400	500
N. glauca	GG	NT	.....	.....	.....	.....	NT
N. suaveolens	SuSu	NT	.....	.....	.....	.....	NT
N. langsdorffii	LL	NT	.....	.....	.....	.....	NT
N. sanderae	SS	NT	.....	.....	.....	.....	NT
N. langs. × N. sand.	LS	NT	.....	.....	.....	.....	NT
N. glauca-langs. (tumorous)	GGLL(T)	T	———	———	———	———	T
N. glauca-langs. (non-tumorous)	GGLL(NT)	NT	.....	.....	.....	.....	NT
N. glauca-langs. (NT) × N. langs.	GL(NT)L	NT	.....	.....	.....	.....	NT
N. glauca-langs. (T × NT)	GGLL(T × NT)	NT	.....	.....	T	———	T
N. suaveolens-glauca	SuSuGG	NT	.....	.....	.....	.....	NT
N. suveolens-langsdorffii	SuSuLL	T	———	———	———	———	T
N. suav.-langs. × N. sanderae	SuLS	NT	.....	.....	.....	.....	NT
N. glauca-langs. × N. sanderae	GLS	NT	.....	.....	.....	.....	NT
N. suav.-glauca × N. sanderae	SuGS	NT	.....	.....	.....	.....	NT
N. suav.-glauca × N. langs.	SuGL	T	———	———	———	———	T

nontumorous in spite of radiation dosages which, at the higher levels, approach lethality. The tumorous combinations (GGLL, SuSuLL, and SuGL) form tumors at all levels with evident enhancement of tumor formation at the higher levels, i.e. from about 300 r per 20-hour day (SPARROW and GUNCKEL 1956, SPARROW and SCHAIRER 1959, SMITH 1958).

Two combinations in Table 5 involve the addition of a *sanderae* genome to tumorous hybrids (SuLS and GLS). No aerial tumors formed under chronic gamma irradiation on any plants of these two genotypes at any of the radiation levels or in the controls. The presence of a complete *sanderae* genome provides "protection" not only from the spontaneous formation of tumors but also from any enhanced initiation or development of tumors owing to irradiation.

Another group of interspecific combinations in Table 5 involve the nontumorous *N. glauca-langsdorffii* (GGLL-NT) and its hybrids with *N. langsdorffii* and tumorous *N. glauca-langsdorffii* (GGLL-T). The nontumorous mutant line produced no tumors at any radiation level up to 450 r per 20-hour day which is close to a lethal dose for the type. This same result was obtained with the cross of GGLL-NT × LL, i.e., the addition of a normal *langsdorffii* genome had no observable influence on the nontumorous condition of the hybrid even under severe radiation exposure. Addition of both an *N. langsdorffii* and an *N. glauca* genome from the

Fig. 4a—c. Time sequence of tumorous development in one plant of the hybrid *N. suaveolens-glauca* × *N. langsdorffii*. a Three months old: note abnormal swollen stems to the left and beginning of basal tumor. b Four months old: abnormal stems and base of plant have become highly tumorous. c Five months old: original tumorous regions dying, previously normal stem becoming tumorous

tumorous amphidiploid to the nontumorous mutant in the cross GGLL(T × NT) gave a genotype which produced tumors at irradiation dosage levels of 200 r per 20-hour day but not in the controls or lower dosages. In a normal environment the nontumorous condition is completely "dominant"; in an environment of 200 to 450 r per day the tumorous condition is allowed to be expressed, conceivably owing to radiation-induced deletions of genetic factors controlling nontumorous expression. Some older clonal plants of GGLL(T × NT) grown for a second season form ground line stem tumors without irradiation.

The remaining interspecific combination shown in Table 5 (SuGL) was formed by crossing the nontumorous amphidiploid *N. suaveolens-glauca* with *N. langsdorffii*, which in hybrids with either species alone of the amphidiploid (SuSuGG) forms tumors. This triple hybrid is a vigorous plant that produced early and often bizarre tumors in both the control (Fig. 4) and gamma irradiation environments. This three-species combination has been produced both by crossing *N. suaveolens-glauca* with *N. langsdorffii* (Table 5) and by crossing

N. suaveolens-langsdorffii with *N. glauca*. The two triple genome combinations, SuGL and SuLG, are phenotypically indistinguishable.

In Table 6 are shown results obtained with growing a series of interspecific recombinant segregants under conditions of exposure to different dosages of gamma irradiation. The first group consists of two types produced by crossing *N. suaveolens-glauca* and *N. glauca-langsdorffii*, respectively, with pollen of a

Table 6. *Tumor expression in segregants from certain hybridizations of Nicotiana grown under various dosage levels of chronic gamma irradiation for approximately 108 days*

Nicotiana Type	Symbol	γ Dosage in r per 20-hour day					
		0	100	200	300	400	500
N. suav.-glauca × sand. (p)	$SuGS^p$	NT	.....	.....	.....	.....	NT
N. glauca-langs. × sand. (p)	GLS^p	NT	.....	.....	.....	.....	NT
N. suav. × langs. ($PRI_1I_2Egb_1b_2$)	$SuL^{P\cdots b_2}$	T	———	———	———	———	T
N. suav.-langs. × langs. ($PRI_1I_2Egb_1b_2$)	$SuLL^{P\cdots b_2}$	T	———	———	———	———	T
N. glauca-langs. (T) × langs. ($PRI_1I_2Egb_1b_2$)	$GLL^{P\cdots b_2}$	NT	.....	→ T	———	———	T
N. glauca × langs. ($PRI_1I_2Egb_1b_2$)	$GL^{P\cdots b_2}$	NT	.....	→ T	———	———	T
N. suav. × F_1 (langs. × sand.)	Su × LS(1)	T	———	———	———	———	T
	(2)	T	———	———	———	———	T
	(3)	T	———	———	———	———	T
	(4)	T	———	———	———	———	T
	(5)	NT	.....	.....	.....	.....	NT
N. suav.-langs. × F_1 (langs. × sand.)	SuL × LS(1)	T	———	———	———	———	T
	(2)	T	———	———	———	———	T
N. suav.-glauca × F_1 (langs. × sand.)	SuG × LS(1)	T	———	———	———	———	T
	(2)	NT	.....	.....	→ T	———	T
	(3)	T	———	———	———	———	T
N. glauca-langs. (T) × F_1 (langs. × sand.)	GL(T) × LS(1)	T	———	———	———	———	T
	(2)	NT	.....	.....	.....	.....	NT
	(3)	NT	.....	→ T	———	———	T
	(4)	NT	.....	.....	→ T	———	T

genotype which is largely *N. sanderae* but contains the marker gene *p* from *N. langsdorffii*. This gene was maintained by selection through six generations of backcrossing to *N. sanderae*. Neither of these introgressive hybrids, designated as $SuGS^p$ and GLS^p, formed tumors under control conditions or under any radiation dosage employed. The small amount of *N. langsdorffii* germplasm associated with the introgressed gene *p* had no observable effect on initiation of tumors even under heavy irradiation. These two types showed the same lack of tumorization as the corresponding three-species hybrids, namely SuGS and GLS, shown in Table 5.

The second group of hybrids in Table 6 consists of four types produced by crossing respectively *N. suaveolens*, *N. suaveolens-langsdorffii*, *N. glauca-langsdorffii* (tumorous), and *N. glauca* with pollen of a genotype which is largely *N. langsdorffii* but contains the marker genes *P*, *R*, I_1, I_2, *E*, *g*, b_1 and b_2 from *N. sanderae* (SMITH 1937a). All these genes were maintained together by selection through four generations of backcrossing to *N. langsdorffii*. The first two introgressive hybrids, designated as $SuL^{P\cdots b_2}$ and $SuLL^{P\cdots b_2}$, form tumors spontaneously (SMITH 1958) and under all levels of irradiation up to 450 r per

20-hour day. At 200 r per day and below there is no significant increase in initiation of new tumors (Smith 1958); at 300 r per day and above there is an evident enhancement of tumorization. The remaining two introgressive hybrids of this group, designated as $GLL^{P\cdots b_2}$ and $GL^{P\cdots b_2}$, are of particular interest. Each failed to form tumors by the end of the growing season in the unirradiated control field, but produced tumors at specific levels of irradiation; $GLL^{P\cdots b_2}$ at 200 r per day and above, $GL^{P\cdots b_2}$ at 300 r per day and above. Thus the influence of the introgressed marker genes and associated germplasm of *N. sanderae* in a genetic mileau that is preponderantly *N. langsdorffii* is such as to give a tumorous response which is intermediate to that of hybrids involving the pure species. A summary of the results with *N. glauca-langsdorffii* genotypes is given in the accompanying tabulation.

Genotype	Environment	
	Unirradiated	Irradiated
GL, GGLL and GLL	tumors	tumors
$GLL^{P\cdots b_2}$	no tumors	tumors from 200 r/d
$GL^{P\cdots b_2}$	no tumors	tumors from 300 r/d
GLS^{p} and GLS	no tumors	no tumors

The third group of hybrids in Table 6 consists of four types produced by crossing, respectively, *N. suaveolens*, *N. suaveolens-langsdorffii*, *N. suaveolens-glauca* and *N. glauca-langsdorffii* with pollen of the F_1 hybrid *N. langsdorffii* × *N. sanderae*. Five segregants of the first cross were tested. Four were tumorous and one nontumorous in the unirradiated control field as well as in the gamma field. Two segregants of the second cross produced tumors spontaneously as well as under chronic irradiation. Three segregants of the third cross, symbolized as SuG × LS, were tested. Two were tumorous under all growing conditions employed; one was nontumorous when unirradiated or exposed to irradiation levels up to 350 r per day. At this dosage and above, this segregant formed tumors by the end of the growing season. Four segregants of the fourth cross, symbolized as GL(T) × LS, were tested. One was tumorous and another nontumorous under all conditions of the experiments. The third segregant did not form tumors from 0 to 250 r per day but at this level and above was tumorous. The fourth segregant did not form tumors from 0 to 300 r per day but at this level and above was tumorous.

These results with recombinants of *N. langsdorffii* × *N. sanderae*, placed in genetic backgrounds that reveal tumor forming capacities, show that not only is there segregation observable in a normal environment but, in addition, there are subtle cryptic inherent differences among genotypes that are manifest only at particular levels of irradiation. Conceivably some of these genotypes are heterozygotes for a dominant tumor suppressing system in which radiation-induced deletions permit expression of tumors. Certain genotypes fail to form tumors throughout the growing season in spite of being exposed to sublethal chronic irradiation.

In addition to investigations of the effects of chronic irradiation on genetically controlled tumor formation, studies with "subacute" irradiation were carried out.

Potted clones of a few Nicotianas were placed in the gamma field for ten days at three dosage levels, namely:

2300 ± 200 r per 20-hour day, total dose 21,000—25,000 r
1650 ± 100 r per 20-hour day, total dose 15,500—17,500 r
1120 ± 50 r per 20-hour day, total dose 10,700—11,700 r

Genotypes were chosen to represent (1) those that form spontaneous tumors without irradiation, (2) those that failed to form tumors even at the highest doses of chronic irradiation, and (3) one, *N. glauca-langsdorffii* (T) × *N. langsdorffii* ($PRI_1I_2Egb_1b_2$), that formed tumors only at levels of 200 r per day and above. The results substantiated those obtained with chronic irradiation, i.e., group (1) formed tumors at each level of subacute irradiation, usually more abundantly at the higher levels; group (2) failed to form tumors at any of the irradiation levels; and the third type produced tumors at each level. Since this third type required a total of about 21,000 r (200 r/d × 108 days) to initiate tumors with chronic irradiation it appeared that the subacute irradiation was at least twice as effective since tumors were produced with a total of about 11,000 r (1120 ± 50 r/d × 10 days).

Effect of Aging

All scoring for tumors described above in genetic studies (Tables 1, 2, 3; Figs. 1, 2), as well as in true breeding cultures irradiated in the gamma fields (Tables 5, 7) was made on first year plants at the end of the growing season. In order to test segregants or any variable cultures at different dosage levels in the gamma field it was necessary to make clonal populations for use during the following year. It was noted that some clonal lines became more tumorous as the plants were kept for an additional year while others did not. Results with 48 clonal lines held for a year or more beyond the first season are shown in Table 7. Seventeen, or about one third, changed to a more tumorous expression. It is evident from these results that if all the segregants comprising the histograms shown in Fig. 2 were more aged before scoring the distribution curve would be shifted to the right. That is there would be fewer segregants classified, for example, in the "0" or nontumorous category, more in the highly tumorous group.

In view of the tumor enhancing effect of both aging and irradiation, it was a matter of interest to explore whether there were any truly "0" type segregants, i.e., individuals that would remain nontumorous if old plants were grown under more prolonged exposures to chronic gamma irradiation. Eight clones were chosen for this investigation as shown below.

No. Original Plants	Type	Seed Sown
2	SuSuGG × LS	April 1959
2	GG × LS	April 1959
2	GGLL(T) × LS	April 1958
1	GGLL(NT)	April 1958
1	GGLL(T × NT)	April 1959

In April 1960, one or two years after sowing of the seed, six clonal plants of each of the above eight original plants were examined for tumors and were then placed in the gamma greenhouse. The examination included washing of the roots

and inspection for occurrence of tumors. One of the segregants of SuSuGG × LS had small tumors on the roots of all clonal plants; the rest were completely free of root tumors as were all of aerial tumors. Of the six clonal plants two each were placed at dosage levels of 100, 200 and 300 r per 20-hour day.

On June 23, 1960, all these clonal plants were transplanted to the gamma field at the same dosage levels at which they had been maintained in the gamma greenhouse. None showed aerial tumors at this time. On October 3, 1960, all plants were again examined for tumors. None were found except on the hybrid GGLL (T × NT) which showed a few very small tumors at 100 r/d and, frequent large tumors at 200 r/d, the level at which tumors appeared (Table 5) on plants exposed only in the field during the summer.

Table 7. *Effect of age on tumor expression in 48 clonal lines developed from segregants, produced with F_1 N. langsdorffii × N. sanderae as the pollen parent, and grown for a year or more beyond the first growing season*

Unchanged clones			Changed clones		
Original Class	Later Class	No. Lines	Original Class	Later Class	No. Lines
0	0	11	0	1	1
1	1	7	0	2	2
2	2	8	0	3	1
3	3	4	1	2	6
4	4	1	1	3	3
	Total	31	2	3	1
			3	4	2
				Total	17

It was concluded that true "0" type segregants exist which are nontumorous not only when grown in the normal field environment or when exposed to chronic irradiation for one growing season (about 108 days) but which still remain nontumorous when older clonal populations are exposed to irradiation for a prolonged period of about 165 days. Other "nontumorous" genotypes as SuLS, GLS, and GLS^p (Tables 5 and 6) will eventually produce tumors mainly at the stem base in some plants of older clonal populations both under control and irradiated conditions. This may be in part a response to the injury involved in making the stem cuttings.

Discussion

Literature review on genetic tumors in *Nicotiana* has been included in relatively recent publications (Näf 1958, Smith 1958, Braun and Stonier 1958) and will not be covered in detail here.

The earliest evidence of genetically determined plant tumors apparently was the observation, made in 1879, that certain reciprocal hybrids between *Brassica* species, commonly known as turnip and rutabaga (presumably *B. rapa* L. and *B. napobrassica* (L) Mill., respectively), produce tumors on the roots (Lund and Kjaerskov 1885). Tumors were also noted on roots of second hybrid generation plants from the same cross. Kajanus (1917) made a more extensive study of F_1, F_2 and F_3 generations of turnip-rutabaga hybrids including observations on some 42,500 individuals. Different F_2 cultures varied in the proportion of tumorous-rooted plants; and the frequency of such types in the F_3 generation corresponded in part with the degree of expression of abnormality in their F_2 parents. Kajanus considered his results interpretable as indicating hereditary determination of differences in chemical composition of the plants, so that the multiplication of an infective tumifacient microorganism in the roots would be favored to

different degrees in different genotypes, and as a consequence, result in corresponding deviations from normal growth and differentiation. Tumorous-rooted plants were more frequent among individuals with yellow flesh than among those with white-fleshed roots.

More recently VOSKRENSKAYA and SHPOTA (1959) have investigated genetically controlled root tumors in other *Brassica* hybrids, namely, mustard (*Brassica juncea* CZERN.) crossed with spring rape (*Brassica oleifera* MOENCH. *f. annua*) and winter rape (*Brassica oleifera* MOENCH. *f. biennis*). Seventy per cent of the F_1 plants and 52 per cent of the F_2 plants were tumorous. F_2 segregants were classified into five types according to morphology and these were found to differ markedly in the percentage of tumorous plants: "new-type mustard", 80 per cent; "intermediate", 64 per cent; "mustard", 59 per cent; "new-rape-like", 30 per cent; and "rape", 14 per cent. The higher porportion of tumorous plants among the first three categories was considered to be associated with a general morphological instability, and was observed also in the F_3 and F_4 generations. It was implied that heterozygosity, "morphological instability", and tendency to form root tumors are associated. The genetic data on *Brassica* hybrid tumors are perhaps more extensive than on any other plant tumors; however, little has been done to relate gene action to tumor formation.

Evidence for genetic control of *Nicotiana* tumors now consists of the following: (1) Tumors form only in hybrids between certain species and these can be placed into at least two groups within which interspecific hybrids are nontumorous and between which the hybrids are tumorous (NÄF 1958). (2) Reciprocal hybrids of *N. glauca* × *N. langsdorffii* give the same tumor expression (KOSTOFF 1943, KEHR 1951). (3) When all twelve chromosomes of *N. glauca* (the genome G) are added to diploid *N. langsdorffii* (LL) the resultant triploid plants (LLG) develop tumors, but tumors fail to develop in plants with only one or a few *glauca* chromosomes added to 2n *langsdorffii* (KEHR and SMITH 1954). (4) Segregation for wide differences in tumor expression occurs in crosses of the F_1 *N. langsdorffii* × *N. sanderae* var. Sutton's Scarlet with *N. glauca*, *N. suaveolens*, and amphidiploids involving these species. (5) Correlation, probably resulting from linkage, is observed in the above cultures between tumors and corolla size.

Abnormal mitoses and consequent alterations in chromosome number are characteristic of genetic tumor tissue. KOSTOFF (1930, 1943) found that aberrant chromosome numbers in somatic tumor cells of *N. glauca* × *N. langsdorffii* were relatively rare (1 in 50) and involved primarily additions (22, 23, 28 and 42) to the normal complement of 21. BURK and TSO (1960) have recently reported that cells in tumor tissue of this same hybrid characteristically involve reduction to 18, 19 and possibly 38 (19 doubled) chromosomes. An informative test to investigate if chromosome loss is causal to tumor formation would be to grow single cell cultures from genetic teratomatous tumor tissue. According to the chromosome-loss hypothesis differentiated plants would not be expected to develop. Single cell cultures of teratomatous crown gall have been proven capable of complete recovery, producing normal plants and progeny (BRAUN 1959). Variation in chromosome number is characteristic of certain other plant tumors (DE TOROK and WHITE 1960) and some animal tumors (LEVAN 1959); but may be coincidental rather than causal to the tumorous condition.

A working hypothesis, stated in general terms, for the causation of genetic plant tumors is that an abnormal nucleic acid condition resulting from association of genes from dissimilar genotypes in interspecific hybrids leads to abnormal production of growth regulatory substances and consequent neoplastic transformation.

Between these initial and ultimate steps the process may be viewed as dependent either on a maldistribution of direct products under DNA control, i.e. RNA (plasmagenes or ribosomes) to protein; or on an accumulative unbalance of other metabolic products of the cell further removed by steps in synthesis from direct nuclear control. On either alternative, the process is considered, according to this hypothesis, as gene controlled but not nuclear gene mutation *per se*. The accumulative intracellular aberrancy ultimately reaches a stage characterized by an unbalance and excess of certain growth regulatory substances (Braun and Stonier 1958), notably auxins (Kehr 1951). The initiation of tumor formation, owing to its accumulative character, is inversely related to rate of normal cell division so that aged, slower growing tissues and those injured by irradiation or chemical means are more prone to form tumors. Once the tumor formation threshold has been reached, it is maintained by the continuing activity of the original nucleic acid aberrancy and all cell descendents are usually tumorous. Under certain cultural conditions (Braun 1959), however, reversion to differentiated growth may occur (Kehr and Smith 1954). The original nucleic acid aberrancy may be genetic (as described in this paper), due to virus infection, or due to an as yet unspecified bacterially introduced tumor inducing principle, designated as TIP (Klein and Braun 1960). Efforts are being made in this laboratory at the present time to characterize differences in metabolic requirements of genetically tumorous vs. nontumorous types when grown as tissue cultures or as seedlings on chemically defined media.

Radiation and chemicals may have at least two different ways of influencing plant tumors, and these can be difficult to separate. The first is by induced mutation in nuclear genes. The mutant form may be less tumorous than the original genotype, as for example the nontumorous *N. glauca-langsdorffii* produced by Izard (1957); or more tumorous, as the cancer-like mutants reported earlier in Antirrhinum (Stein 1935; Stein and Weihe 1937). The second type of radiation response is an effect upon tumor expression during plant development (see e. g. Stein, Sparrow and Schairer 1959). This appears to result directly from metabolic disturbance at the cellular level rather than from chromosomal damage or gene mutation (Smith 1958) but the distinction is refractory to proof (Schultz 1959). This is particularly so in plants heterozygous for a dominant tumor suppressing system in which radiation-induced deletions may permit expression of tumors. The antiauxin triiodobenzoic acid will enhance tumor formation in *N. glauca-langsdorffii* to give effects comparable to those of irradiation (Sparrow and Schairer 1959). In fern prothalli radiation-induced tumorization can be suppressed by incorporation of certain amino acids in the cultura media (Partanen 1960). Clearly, certain chemicals applied to plants or incorporated in culture media can either enhance or inhibit tumor formation whether arising spontaneously or induced by radiation.

Much of what has been discussed in relation to plant tumors is equally applicable to animal tumors (Gordon 1951). In some respects the interpretations in the present paper differ from those expressed in recent summary publications (Huxley 1956, 1957; Lederberg 1958; Strong 1958; Darlington 1959; Schultz 1959; Heston 1959; Klein and Klein 1959; Burdette 1959, Upton, et al. 1960). In plant material a cell altered to the tumorous condition is apparently more easily reversed to normal growth by appropriate environmental conditions than is the case with animal tumor cells.

Summary

Tumors are formed in hybrids and amphidiploids combining the species *Nicotiana langsdorffii* with *N. glauca* or *N. suaveolens*. Addition of an *N. sanderae* genome to these combinations suppresses aerial tumor formation. When the F_1, *N. langsdorffii* × *N. sanderae*, is crossed with *N. suaveolens*, *N. glauca* or amphidiploids involving these species, segregation and recombination gives plants with wide differences in tumor expression. Additional evidence of genetic control is afforded by correlations, probably representing linkages, between presence of tumors and marker genes from *N. langsdorffii*, lack of tumors and marker genes from *N. sanderae*. A nontumorous mutant of *N. glauca-langsdorffii*, induced by x-raying seeds (Izard 1957), gives F_1 hybrids with no tumors when crossed with the tumor forming amphidiploid.

A number of different genotypes involving the species *N. glauca* and *N. suaveolens* combined with genomes or gene recombinations of *N. langsdorffii* and *N. sanderae* were grown for approximately 108 days under γ radiation of from 5 to 450 r per 20-hour day. Certain genotypes, including the radiation induced mutant, produced no tumors in unirradiated controls or at any level of irradiation including the highest dosages. Others produced tumors at all dosages as well as in the controls. A third group formed tumors late in the season only under γ irradiation, beginning at levels of 200 to 350 r per 20-hour day depending on the genotype. Aging accentuated tumor formation in some genotypes, but not in others.

In general terms, tumor formation is viewed as: (1) initiated through an abnormal nucleic acid condition (nuclear genes, plasmagenes, viruses or bacterial tumor-inducing principle), (2) dependent on maldistribution or an accumulative unbalance of nucleic-acid directed metabolic products, (3) resulting in abnormal production of growth regulatory substances maintained at levels for tumorous growth through the continuing action of the basic nucleic acid aberrancy.

Literature

Braun, A. C.: A demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single cell origin. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **45**, 932—938 (1959).

—, and T. Stonier: Morphology and physiology of plant tumors. Protoplasmatologia **10**, 1—93 (1958).

Brieger, F. G., e R. Forster: Tumores em certos hibridos do gênero *Nicotiana*. Bragantia **2**, 259—274 (1942).

Burdette, W. J.: Tumors in *Drosophila*. In: Biolog. Contributions, Publ. No 5914, p. 57—68. Austin: Univ. Texas 1959.

Burk, L. G., and T. C. Tso: Genetic tumors of Nicotiana associated with chromosome loss. J. Hered. **51**, 184—187 (1960).

Cochran, W. G.: Some methods for strengthening the common χ^2 tests. Biometrics **10**, 417—451 (1954).

Darlington, C. D.: Plasmagene theory and cancer genesis. In: Genetics and cancer, p. 9—24. Austin: Univ. Texas 1959.

Gordon, M.: Genetic and correlated studies of normal and atypical pigment cell growth. Growth **10**, 153—219 (1951).

Heston, W. E.: Site of gene action and carcinogenesis. In: Genetics and cancer, p. 226—240. Austin: Univ. Texas 1959.

Huxley, J.: Cancer biology: comparative and genetic. Biol. Rev. **31**, 474—514 (1956).

— Cancer biology: viral and epigenetic. Biol. Rev. **32**, 1—37 (1957).

Izard, C.: Obtention et fixation de lignées tumorales et non tumorales à partir de mutations expérimentales de l'hybride *N. glauca* × *N. langsdorffii*. C. R. Acad. agr. France **43** (6), 325—327 (1957).

Kajanus, B.: Über Bastardierungen zwischen *Brassica napus* L. und *Brassica rapa* L. Z. Pflanzenzüchtung **5**, 265—322 (1917).

Kehr, A. E.: Genetic tumors in *Nicotiana*. Amer. Naturalist **85**, 51—64 (1951).

—, and H. H. Smith: Genetic tumors in Nicotiana hybrids. Brookhaven Symposia in Biol. **6**, 55—78 (1954).

Klein, G., and E. Klein: Cytogenetics of experimental tumors. In: Genetics and cancer, p. 241—270. Austin: Univ. Texas 1959.

Klein, R. M., and A. C. Braun: On the presumed sterile induction of plant tumors. Science **131**, 1612 (1960).

Kostoff, D.: Tumors and other malformations on certain Nicotiana hybrids. Zbl. Bakt., Parasitenk., II. Abt. **81**, 244—260 (1930).

— Cytogenetics of the genus *Nicotiana*. Sofia, Bulgaria: States Printing House 1943.

Lederberg, J.: Genetic approaches to somatic cell variation: summary comment. J. cell. comp. Physiol. **52**, Suppl. 1, 383—401 (1958).

Levan, A.: Relation of chromosome status to the origin and progression of tumors: the evidence of chromosome numbers. In: Genetics and cancer, p. 151—182. Austin: Univ. Texas 1959.

Lund, S., and H. Kjaerskov: Morphological and anatomical description of *Brassica oleracea* L., *B. campestris* (L.) and *B. napus* (L.) (garden cabbage, rutabaga and rape) with accounts of pollination and cultivation experiments with these species. Bot. Tidsskr. **15**, 1—150 (1885).

Näf, U.: Studies on tumor formation in *Nicotiana* hybrids. I. The classification of the parents into two etiologically significant groups. Growth **22**, 167—180 (1958).

Nagel, L.: Morphogenetic differences between *Nicotiana alata* and *N. langsdorffii* as indicated by their response to indolacetic acid. Ann. Missouri Bot. Garden **26**, 349—372 (1939).

Partanen, C. R.: Amino acid suppression of radiation-induced tumorization of fern prothalli. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **46**, 1206—1210 (1960).

Schultz, J.: The role of somatic mutation in neoplastic growth. In: Genetics and cancer, p. 25—42. Austin: Univ. Texas 1959.

Smith, H. H.: Inheritance of corolla color in the cross *Nicotiana langsdorffii* by *N. sanderae*. Genetics **22**, 347—360 (1937a).

— The relation between genes affecting size and color in certain species of *Nicotiana*. Genetics **22**, 361—375 (1937b).

— Effects of genome balance, polyploidy, and single extra chromosomes on size in *Nicotiana*. Genetics **28**, 227—236 (1943).

— Genetic plant tumors in *Nicotiana*. Ann. N.Y. Acad. Sci. **71**, 1163—1177 (1958).

—, and D. S. Robson: A quantitative inheritance study of dimensions of flower parts in tobacco. Biometrics **15**, 147 (1959).

Sparrow, A. H., and J. E. Gunckel: Induction of tumours by ionizing radiation on stems, leaves and roots of an interspecific *Nicotiana* hybrid. In: Progress in Radiobiology, p. 485—488. London: Oliver & Boyd 1956.

—, and L. A. Schairer: Some factors influencing radioresistance and tumor induction in plants. Proc. Intern. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy 2nd Conf. **27**, 335—340 (1959).

Stein, E.: Zur Genetik, Histologie und Zytologie einer neuen, durch Radiumbestrahlung erzeugten krebsigen Entartung von *Antirrhinum majus*. (Aus Gengruppe B.). Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **70**, 525—531 (1935).

—, u. M. Weihe: Weitere Analyse der somatisch induzierten Erbänderungen von *Antirrhinum majus* (Gruppe A und B) und der darin enthaltenen Anlagen für Krebsentartung. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **72**, 519—539 (1937).

Stein, O. L., A. H. Sparrow and L. A. Schairer: Leaf tumors induced in *Graptopetalum paraguayense* by gamma radiation. Cancer Res. **19**, 746—748 (1959).

Strong, L. C.: Genetic concept for the origin of cancer: historical review. Ann. N.Y. Acad. Sci. **71**, 810—838 (1958).

Torok, D. de, and R. R. White: Cytological instability in tumors of *Picea glauca*. Science **131**, 730—732 (1960).

Upton, A. C., A. W. Kimball, J. Furth, K. W. Christenberry and W. H. Benedict: Some delayed effects of atom-bomb radiations in mice. Cancer Res. **20**, 1—62 (1960).

Voskresenskaya, G. S., and V. I. Shpota: Genetic tumors in distant plant hybrids and their use in selection. Dokl. Akad. Nauk. SSSR. (Biol. Sci.) **124** (1), 195—197 (1959).

Dr. Harold H. Smith,
Department of Biology, Brookhaven National Laboratory, Upton, L.I., New York

Zeitschrift für Vererbungslehre 92, 119—125 (1961)

Aus dem Zoologisch-Vergl. anatomischen Institut der Universität Zürich

WEITERE UNTERSUCHUNGEN ZU KOMPLEMENTARITÄT UND NICHT-AUTONOMIE DER AUGENFARB-MUTANTEN *MA-L* UND *MA-L*^{BZ} VON *DROSOPHILA MELANOGASTER* *

Von

H. URSPRUNG **

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. März 1961)

Einleitung und Problemstellung

Die beiden Augenfarb-Mutanten *maroon-like (ma-l)* und *bronzy (bz)* des rechten Endes des X-Chromosoms zeichnen sich wie die Mutante *rosy* (*ry*; HADORN und SCHWINCK 1956) durch fehlende Aktivität des Enzyms Xanthindehydrogenase aus (GLASSMAN and MITCHELL 1959, GLASSMAN 1959, 1960). Infolgedessen können diese Fliegen kein Isoxanthopterin aufbauen, dessen Vorstufe, 2-Amino-6-oxypterin, akkumuliert wird. Zudem ist der Gehalt an roten Augenpigmenten (Drosopterinen) herabgesetzt. Nun läßt sich nach GLASSMAN (1959, 1960) im Compound *ma-l/bz* eine wenn auch geringe Enzymaktivität nachweisen; dementsprechend enthalten solche Compound-Weibchen Spuren von Isoxanthopterin; die Augenfarbe ist zudem vom Wildtyp nicht unterscheidbar. In einem 5000 Männchen umfassenden Crossing-over-Versuch beobachtete GLASSMAN kein Austauschtier; *ma-l* und *bz* müssen demnach sehr eng gekoppelt sein. Die Befunde sind besonders interessant, weil hier Komplementarität auf dem Niveau eines bekannten Enzyms vorliegt.

Nun ist aber zu berücksichtigen, daß GLASSMAN seine Daten an Compounds der Konstitution *v bz/v f B* × *ma-l* gewonnen hat. Aus Untersuchungen an *Ephestia* (KÜHN und EGELHAAF 1955) und *Drosophila* (Dr. S. KAUFMAN, unveröffentlicht) ist bekannt, daß Ommochrom- und Pterinstoffwechsel auf irgendeine Weise in Zusammenhang stehen. Es schien uns deshalb lohnend, die Befunde GLASSMANS an reinen, nicht mit *v* markierten *bz*- und *ma-l*-Stämmen nachzuprüfen. Gleichzeitig wollten wir untersuchen, wie sich Nachkommen aus Kreuzungen von *ma-l* bzw. *bz* mit dem in einem anderen Chromosom gelegenen Faktor *ry* verhalten. Dabei müßte sich zeigen, ob die für den *ma-l/bz*-Compound typische, unvollständige Komplementierung wirklich charakteristisch für die beiden Allele sei und nicht auch bei anderen Heterozygoten vorkomme. Diese Möglichkeit ist nicht zum vorneherein auszuschließen, da bei Augenfarbgenen Fälle unvollständiger Dominanz im Pterinmuster bekannt sind (ZIEGLER-GÜNDER und HADORN 1958). Schließlich stellten wir uns die Frage, ob die beiden Mutanten sich autonom oder nicht-autonom verhalten.

* Ausgeführt mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung. Herrn Prof. Dr. E. HADORN danke ich herzlich für die Förderung dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. U. LEUPOLD für kritische Diskussion.

** Gegenwärtige Adresse: Mergenthaler Laboratory for Biology, The Johns Hopkins University, Baltimore 18, Maryland (USA).

Material und Methoden

a) Stämme. Als Wildstamm verwendeten wir den seit vielen Jahren im Institut gehaltenen Stamm *Sevelen*. Den *ma-l*-Stamm erhielten wir vom California Institute of Technology, Pasadena, die Stämme *bz* und *v bz* von Dr. E. Glassman. Den *r ma-l*-Stamm stellten wir selbst her.

b) Chromatographie. Köpfe und Hoden bzw. Abdomina von einer bzw. zwei Fliegen wurden mit einem Glasstab direkt auf Chromatographiepapier Whatman Nr. 1 zerrieben und nach der Methode von Hadorn und Mitchell (1951) in Propanol : 1% Ammoniak (2:1) aufsteigend chromatographiert. Zur Extraktion wurden 40 mg Fliegen in 0,5 ml des gleichen Lösungsmittels homogenisiert, zentrifugiert und vom Überstehenden 0,2 ml auf Chromatographiepapier aufgetragen. Die Fluorescenz wurde nach der Methode von Hadorn und Kühn (1953) direkt vom Papier gemessen.

c) Assay. Für den Assay für Xanthindehydrogenase folgten wir im wesentlichen der Methode von Glassman und Mitchell (1959). 40 mg Fliegen werden in 1,0 ml eiskaltem Tris-Puffer (Sigma) vom p_H 8 homogenisiert. Zum Homogenat werden 40 mg Carbo adsorbens (Siegfried) gegeben. Nach 30 min Stehenlassen bei 0° C und mehrmaligem Umschütteln wird das Gemisch 15 min. bei 20000 g bei 0° zentrifugiert. Zur Kontrolle, daß die Absorption der im Homogenat vorhandenen fluoreszierenden Stoffe quantitativ erfolgt ist, wird vom Überstehenden 0,05 ml auf Chromatographiepapier aufgetragen. Weitere 0,5 ml des Überstehenden werden mit 0,02 ml 2-Amino-6-oxypterin (10^{-3} M) und 0,02 ml Methylenblau (10^{-3} M) bei 25° C während 2 Std inkubiert. Die Reaktion wird durch Eintauchen des Reagensglases in siedendes Wasser unterbrochen. Vom Reaktionsgemisch wird 0,05 ml auf Chromatographiepapier aufgetragen. Chromatographie s. b). Die Gegenwart von Isoxanthopterin beweist die Enzymaktivität.

d) Nicht-Autonomie. Nach der Methode von Hadorn und Schwinck (1956) implantierten wir beide Paare Malpighischer Gefäße einer verpuppungsreifen Spenderlarve in 88 Std (nach Eiablage) alte männliche Wirtslarven. Augen und Hoden der Wirte wurde 3d nach dem Schlüpfen chromatographiert.

Ergebnisse

A. Komplementierung

1. Drosopterine. Aus der Abb. 1 gehen folgende Ergebnisse hervor:

a) Der Drosopteringehalt der Heterozygoten *ry*/+, +/*ry*, +/*bz*, +/*ma-l*, *ry*/*ma-l* und *ry*/*bz* unterscheidet sich auf entsprechenden Altersstufen kaum vom Wildtyp. Eine Ausnahme macht vielleicht +/*bz*. Da unsere Messungen aber auf Individuen, nicht auf Gewicht bezogen sind, kann der geringfügigen Minderleistung nicht viel Bedeutung beigemessen werden. Weibchen der Konstitution *ma-l*/*ry* und *bz*/*ry* sowie *bz*/+ und *ma-l*/+ scheinen gleich viel Drosopterine zu bilden wie der Wildtyp.

b) Die hemizygoten Männchen aus den Kreuzungen *bz* × +, *ma-l* × +, *bz* × *ma-l*, *ma-l* × *bz*, *ma-l* × *ry* und *bz* × *ry* enthalten gleich viel Drosopterine wie Männchen der Konstitution *ry*/*ry*, *bz*/ und *ma-l*/.

c) Die Compound-Weibchen *bz*/*ma-l* und *ma-l*/*bz* bilden mehr Drosopterine als die Homozygoten *bz*/*bz* und *ma-l*/*ma-l*. Die Differenz von *bz*/*ma-l* gegenüber *bz*/*bz* und *ma-l*/*ma-l* ist am ersten Tag nach dem Schlüpfen der Fliegen nur schwach gesichert ($p < 0{,}05$; *t*-Test), am dritten und siebenten Tag aber sehr gut gesichert ($p < 0{,}01$). Die Differenz von *ma-l*/*bz* gegenüber *bz*/*bz* und *ma-l*/*ma-l* ist auf jeder Altersstufe mit $p < 0{,}01$ gesichert.

d) Diese Komplementierung scheint aber insofern nicht vollständig zu sein, als in den Compound-Weibchen der Drosopteringehalt des Wildtyps nicht erreicht wird. Die Differenzen zwischen *bz*/*ma-l* bzw. *ma-l*/*bz* und +/+ sind auf allen Altersstufen gesichert ($p < 0{,}01$).

Beim Compound ist jedoch vom 1. zum 3. Tag ein besonders starker Anstieg des Drosopteringehaltes zu beobachten. Man kann deshalb vermuten, daß in noch älteren Fliegen die Drosopterinmenge des Wildtyps erreicht würde. Zur Lösung dieser Frage wurde in einem weiteren Experiment der Drosopteringehalt 14 d alter

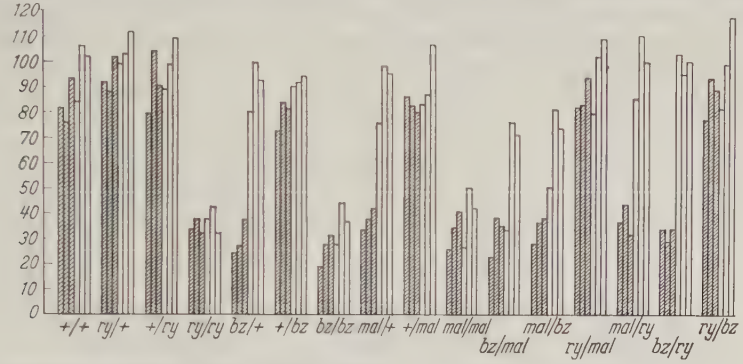


Abb. 1. Mittlere Drosopterinmengen in willkürlichen Fluorescenzeinheiten (Ordinate) bei verschiedenen Genotypen (Abszisse) für Männchen (schraffierte) und Weibchen (weiße Säulen). Die Säule ganz links eines Dreierblocks bezeichnet die Messungen an frischgeschlüpften Fliegen (< 1 d alt), die mittlere Säule gilt für 3 d alte, die rechte Säule für 7 d alte Fliegen. Jede Säule gibt das Mittel aus fünf Flecken zu je zwei Köpfen an. Das Gensymbol links des Bruchstriches bezeichnet den Genotypus der Mutter, das Symbol rechts den Genotypus des Vaters

Fliegen bestimmt. Diese Fliegen wurden überdies vor dem Auftragen auf das Chromatographiepapier gewogen. Daraus mußte ersichtlich werden, ob ein allfälliger Unterschied im Drosopteringehalt einfach durch veränderte Entwicklungsgeschwindigkeit und/oder kleineres Endgewicht der Compound-Weibchen erklärbar sei. Die Ergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt. Bei 14tägigen Fliegen ist der Unterschied im Drosopteringehalt zwischen +/+ und Compound nur noch auf dem 2%-Niveau gesichert. Nun sind die Compound-Weibchen aber rund 12% leichter als Wildfliegen (Frischgewicht). Wir rechneten deshalb den Drosopteringehalt der Compound-Weibchen auf Wildtypgewicht um (schraffierte Säulen der Abb. 2). Damit verschwindet der Unterschied völlig.

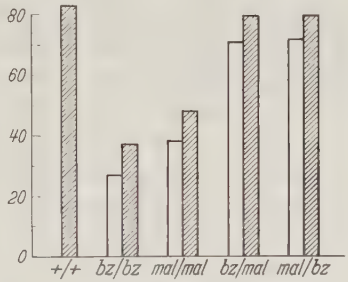


Abb. 2. Drosopteringehalt 14 d alter Weibchen verschiedener Genotypen. Weiße Säulen: tatsächliche Messung; schraffierte Säulen: Wert nach Umrechnung auf Wildtyp-Gewicht. Bei +/+ decken sich weiße und schraffierte Säule. Übrige Erklärungen vgl. Abb. 1

Zusammenfassend stellen wir somit fest, daß *Compounds, hervorgegangen aus Kreuzungen reiner bz- und ma-l-Stämme, schließlich in bezug auf die Drosopterinmenge volle Komplementierung aufweisen.* Äußerlich sind die Augen der Compound-Weibchen vom Wildtyp nicht unterscheidbar.

2. Isoxanthopterin. Aus der Abb. 3 gehen folgende Ergebnisse hervor:

a) Der Isoxanthopteringehalt der Heterozygoten *ry*/+, +/*ry*, +/*bz*, +/*ma-l*, *ry*/*ma-l* und *ry*/*bz* unterscheidet sich kaum vom Wildtyp. Dasselbe gilt für die heterozygoten Weibchen *bz*/+, *ma-l*/+, *ma-l*/*ry* und *bz*/*ry*. Die Weibchen enthalten durchwegs viel weniger Isoxanthopterin als die Männchen. Diese letztere

Beobachtung ist schon wiederholt gemacht worden und beruht auf dem großen Isoxanthopteringehalt der Hoden (HADORN, GRAF und URSPRUNG 1958).

b) Die hemizygoten Männchen aus den Kreuzungen *bz* × +, *ma-l* × +, *bz* × *ma-l*, *ma-l* × *bz*, *ma-l* × *ry* und *bz* × *ry* enthalten wie *ry/ry*, *bz/bz* (bzw. *bz/*) und *ma-l/ma-l* (bzw. *ma-l/*) kein Isoxanthopterin.

c) Auch bei den Compound-Weibchen *bz/ma-l* und *ma-l/bz* ist mit dieser Methode kein Isoxanthopterin nachzuweisen.

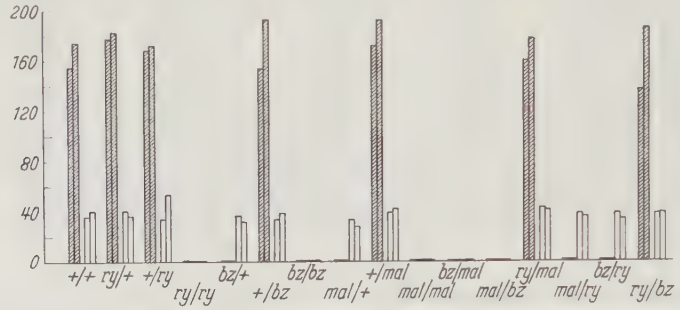


Abb. 3. Isoxanthopteringehalt der Abdomina eintägiger (Säule links jedes Zweierblocks) und dreitägiger Fliegen (Säule rechts). Jede Säule gibt das Mittel aus fünf Flecken zu je zwei Abdomina an. Übrige Erklärungen vgl. Abb. 1

Zur Überprüfung dieses negativen Befundes extrahierten wir 3 d alte Fliegen aller jener Genotypen, bei denen im Chromatogramm kein Isoxanthopterin gefunden wurde. Im Extrakt war jetzt Isoxanthopterin vorhanden bei den Compound-Weibchen *bz/ma-l* und *ma-l/bz*; die Menge betrug aber weniger als 10% des Wildtyps. Bei *ry/ry*, *ma-l/ma-l* (bzw. *ma-l/*) und *bz/bz* (bezw. *bz/*) war auch jetzt keine Spur dieser Verbindung festzustellen. Die gleichen Untersuchungen wurden für Compound-Weibchen der Genotypen *v ma-l/v bz* bzw. *v bz/v ma-l* durchgeführt. Auch hier erreichte der Isoxanthopteringehalt weniger als 10% des Wildtyps.

Zusammenfassend stellen wir somit fest, daß *Compounds, hervorgegangen aus Kreuzungen reiner bz- und ma-l-Stämme, Komplementarität aufweisen in bezug auf Bildung von Isoxanthopterin.* Das Ausmaß dieser Komplementaritätsleistung unterscheidet sich kaum von den Befunden an den *v bz/v ma-l*-Compounds. *Quantitativ ist aber diese Komplementierung sehr unvollständig;* der Isoxanthopteringehalt des Wildtyps wird bei weitem nicht erreicht. Bei allen anderen Heterozygoten wird die für den Wildtyp charakteristische Isoxanthopterinmenge gebildet.

3. Xanthindehydrogenase-Aktivität. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Assays für Xanthindehydrogenase zusammengestellt. Wir stellen fest, daß die Compound-Weibchen eine Enzymaktivität aufweisen, die etwa $^1/_5$—$^1/_6$ der Akti-

Tabelle 1. *Xanthindehydrogenaseaktivität in 4 d alten Weibchen verschiedener Genotypen*

Als Maß dient die Bildung von Isoxanthopterin aus zugegebenem 2-Amino-6-oxypteridin in Homogenaten, gemessen in willkürlichen Fluorescenzeinheiten.

	Genotyp								
	+/+	*bz/ma-l*	*ma-l/bz*	*bz/bz*	*ma-l/ma-l*	*v bz/v ma-l*	*v ma-l/v bz*	*v bz/v bz*	*v ma-l/v ma-l*
Isoxanthopterin	77	14	13	0	0	14	18	0	0

vität im Wildtyp erreicht. Das gilt sowohl für die Compounds der reinen Stämme wie für die mit *v* markierten Genotypen.

4. Auftreten eines unbekannten Stoffes beim Enzym-Assay. Auf einzelnen Chromatogrammen des Reaktionsgemisches des beschriebenen Assays fanden wir eine hellviolett fluorescierende Fraktion (R_f 0,53) oberhalb des 2-Amino-6-oxypterin-Fleckens (R_f 0,43). Folgende Eigenschaften dieses X-Stoffes wurden bis jetzt ermittelt:

a) Er tritt nur auf, wenn alle beim Assay verwendeten Komponenten vorhanden sind. Einzig die Notwendigkeit von Methylenblau wurde nicht überprüft.

b) Er tritt nur auf, wenn das Homogenat nicht (*ma-l*, *bz*, *ry*, gekochter Extrakt aus Wildtyp) oder schwach (*ma-l*/*bz*) aktiv ist.

c) Mit zunehmender Enzymaktivität bzw. Inkubationszeit verschwindet er in gleichem Maße wie 2-Amino-6-oxypterin.

d) Je mehr 2-Amino-6-oxypterin dem Reaktionsgemisch zugegeben wird, desto mehr X-Stoff entsteht.

e) X tritt nur auf Chromatogrammen auf, die in drei bis vier Wochen altem Lösungsmittel entwickelt werden. Dieses Lösungsmittel hat (wegen Verdunsten des Ammoniaks) $p_H \sim 7$, gegenüber $p_H \sim 9$ in frischem Lösungsmittel.

Auf Grund der angegebenen Daten vermuten wir, daß es sich bei X um eine isomere Form von 2-Amino-6-oxypterin handelt. Es könnte sein, daß allgemein die Bildung von Isoxanthopterin aus 2-Amino-6-oxypterin auf dem Wege über X erfolgt. Bei starker Enzymaktivität bzw. langer Inkubation ist kein 2-Amino-6-oxypterin mehr vorhanden, also auch kein X. Bei schwacher Enzymaktivität sind beide noch vorhanden. Es müßte weiter angenommen werden, daß 2-Amino-6-oxypterin und X nur im alten Lösungsmittel getrennt werden.

B. Nicht-Autonomie

Tabelle 2 gibt die in den verschiedenen Versuchsanordnungen erhaltenen Resultate wieder.

Wir sehen zunächst, daß die Transplantation selbst eine kleine, aber deutliche Verminderung des Drosopteringehaltes bewirkt; die Differenzen 1—2 bzw. 4—5 sind mit $p < 0{,}05$ gesichert (*t*-Test). Dann zeigt sich, daß der Drosopteringehalt der Wirtsaugen bei Implantation von Malpighischen Gefäßen des Wildtyps mehr als verdoppelt wird; die Differenzen 2—3 und 5—6 sind mit $p < 0{,}01$ sehr gut gesichert. Aus den Experimenten 3 und 6 geht sodann hervor, daß nach Implantation von Malpighischen Gefäßen aus Wildlarven in den Wirtshoden Isoxanthopterin gefunden wird. Der Vergleich mit den Wildtypkontrollen (7) zeigt schließlich, daß die erreichte Normalisierung keineswegs vollständig ist. Damit ist an den einen *bz*- und *ma-l*-Stämmen das Ergebnis bestätigt, das wir schon für den Stamm *v bz* gefunden hatten (Ursprung 1959). In jener Arbeit hatten wir auch mitgeteilt, daß *v bz*-Augenanlagen in +-Wirten mehr Drosopterine bilden als in *v bz*-Wirten. Dasselbe hat Prof. Dr. E. Hadorn (unveröffentlicht) an *ma-l*-Augenanlagen gefunden.

Tabelle 2. *Versuchsanordnungen und Ergebnisse der Transplantationsexperimente zur Nicht-Autonomie*

Experiment	Spender der Malpighischen Gefäße	Wirt	*n*	Drosopterin pro Augenpaar des Wirtes		Isoxanthopterin pro Hodenpaar des Wirtes	
				$\bar{x}$	*s*	$\bar{x}$	*s*
1	—	*ma-l K*	11	20,2	4,02	0	—
2	*ma-l*	*ma-l*	10	15,8	4,71	0	—
3	+	*ma-l*	11	32,2	7,63	8,5	6,17
4	—	*bz K*	21	16,0	3,93	0	—
5	*bz*	*bz*	9	12,2	4,68	0	—
6	+	*bz*	14	25,4	10,21	9,5	6,69
7	—	+ *K*	12	55,3	12,40	78,7	6,28

n gemessene Flecken; $\bar{x}$ mittlere Fluorescenzintensität, gemessen in willkürlichen Einheiten; *s* ihre Standardabweichung; *K* Kontrolle, nicht injiziert.

Bei der Sektion der Wirtsfliegen konnten wir immer wieder beobachten, daß die implantierten Malpighischen Gefäße rote Granula enthalten. Wir hatten diese Granula schon früher beobachtet und konnten nachweisen, daß es sich dabei um Ommochromschollen handelt (Ursprung, Graf und Anders 1958).

Zusammenfassend stellen wir fest, daß sich ma-l und bz mit Bezug auf Drosopterin- und Isoxanthopteringehalt von Augen und Hoden nicht-autonom verhalten.

Diskussion

Aus den dargelegten Befunden geht hervor, daß die Komplementarität in den Compound-Weibchen tatsächlich, wie Glassman (1959, 1960) es angenommen hat, spezifisch durch die beiden Mutationszustände *ma-l* und *bz* und unabhängig von Markierern oder genotypischem Milieu zustande kommt. Es stellt sich daher die Frage der Allelie. Nach Pontecorvo (1959) spricht man von (funktionellen) Allelen dann, wenn zwei Mutationszustände sich im Compound nicht komplementär verhalten. Danach wären *bz* und *ma-l* nicht allelisch. Nun sind aber seither vor allem an Mikroorganismen zahlreiche Fälle bekannt geworden, wo zwischen verschiedenen „Sites" ein und desselben Genlocus, der ein Enzym kontrolliert, Komplementierung erfolgt. Für diese Untereinheiten eines Genes verwenden Demerec und Hartman (1959) den Terminus „Komplementierungs-Einheiten". Mit solchen Komplementierungseinheiten eines Genlocus haben wir es wohl im Falle von *ma-l* und *bz* zu tun. Es muß in unserem Fall besonders hervorgehoben werden, daß dieser Schluß sich einzig auf die Tatsache der Komplementierung stützt. Die biochemische Ähnlichkeit der beiden Mutanten — Übereinstimmung im Pterinmuster, Fehlen der Xanthindehydrogenase und Nicht-Autonomie — braucht allein nicht ein Anzeichen der Allelie zu sein; die im dritten Chromosom gelegene Mutation *rosy* bewirkt die gleichen Eigenschaften.

Wenn die jetzt postulierten Komplementierungseinheiten auch weniger als 0,005 Morgan-Einheiten voneinander entfernt sind, so ist dennoch bei Steigerung des Auflösungsvermögens der Rekombinationsanalyse (Pontecorvo 1959) Crossing-over zu erwarten. Weitere Informationen über die funktionellen Verluste der Mutanten sind aus reziproken Transplantationen mutierter Gewebe zu erwarten, die im Wildtyp hohe Enzymaktivität aufweisen (Ursprung und Hadorn 1961), sowie aus immunologischen Untersuchungen der Enzymproteine, wie sie von Glassman und Mitchell (1959) an *rosy* durchgeführt wurden.

Summary

Data found by Glassman (1959, 1960) in compound females of the genotype *v bz/v f B* × *ma-l* (where *bz* stands for *ma-l*^{bz}) showed complementation between these "alleles" in both eye color and activity of the enzyme, xanthine dehydrogenase, the latter however being incomplete. These results have been reexamined and extended, using compounds of pure *bz* and *ma-l* stocks as well as various heterozygotes between these stocks and the mutant *rosy*. Complementation in the red eye pigments (drosopterines), though incomplete in newly emerged compound females *ma-l/bz* and *bz/ma-l* becomes firmly established in older flies, where the red pigments reach the amount present in wildtype eyes. Isoxanthopterin however, as well as enzyme activity do not exceed approximately 10% of the level typical for wildtype. These features of slow and incomplete complementation

are very probably due to the interaction of *ma-l* and *bz*; they do not occur in a series of other related heterozygotes.

Transplantation experiments revealed non-autonomy of both *ma-l* and *bz* with regard to the formation of drosopterines in the eyes and isoxanthopterin in the testes.

The results are discussed with respect to the allelism of the two mutants.

Literatur

Demerec, M., and P. E. Hartman: Complex loci in microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. **13**, 377—406 (1959).

Glassman, E.: Allelism and complementation of *bronzy (bz)* and *maroon-like (ma-l)* eye-color mutants in *Drosophila melanogaster*. Drosophile Information Service 33, p. 135, 1959.

— Complementation at the *maroon-like* eye color locus of *Drosophila melanogaster*. Science **131**, 1810 (1960).

—, and H. K. Mitchell: Mutants of *Drosophila melanogaster* deficient in xanthine dehydrogenase. Genetics **44**, 153—162 (1959).

Hadorn, E., G. E. Graf u. H. Ursprung: Der Isoxanthopteringehalt transplantierter Hoden von *Drosophila melanogaster* als nicht-autonomes Merkmal. Rev. suisse Zool. **65**, 335–342 (1958).

—, u. A. Kühn: Chromatographische und fluorometrische Untersuchungen zur biochemischen Polyphänie von Augenfarbgenen bei *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. 8b, 582—589 (1953).

—, and H. K. Mitchell: Properties of mutants of *Drosophila melanogaster* and changes in development as revealed by paper chromatography. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **37**, 650—665 (1951).

—, u. I. Schwinck: Fehlen von Isoxanthopterin und Nicht-Autonomie in der Bildung der roten Augenpigmente bei einer Mutante *(rosy²)* von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 528—553 (1956).

Kühn, A., u. A. Egelhaaf: Zur chemischen Polyphänie bei *Ephestia kühniella*. Naturwissenschaften **42**, 634—635 (1955).

Pontecorvo, G.: Trends in genetic analysis, p. 1–145. New York: Columbia University Press 1958.

Ursprung, H.: Nonautonomy of the eye-color mutant *bronzy* (*bz*, 1–64,9, Fahmy, Dis-32). Drosophila Information Service **33**, p. 174, 1959.

— G. E. Graf u. G. Anders: Experimentell ausgelöste Bildung von rotem Pigment in den Malpighischen Gefäßen von *Drosophila melanogaster*. Rev. suisse Zool. **65**, 449—460 (1958).

—, u. E. Hadorn: Xanthindehydrogenase in Organen von *Drosophila melanogaster*. Experientia (Basel) 1961, (im Druck).

Ziegler-Günder, I., u. E. Hadorn: Manifestation rezessiver Augenfarbgene im Pterininventar heterozygoter Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **89**, 235—245 (1958).

Dr. H. Ursprung,
Zoologisch-Vergl. Anatomisches Institut der Universität Zürich/Schweiz

Zeitschrift für Vererbungslehre 92, 126—132 (1961)

Aus dem Max Planck-Institut für Biologie, Tübingen

FLUORESZIERENDE STOFFE UND OMMOCHROME BEI GENOTYPEN VON *PLODIA INTERPUNCTELLA*

Von

Alfred Kühn und Francisco Ferrand de Almeida*

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. April 1961)

Bei den Augenfarbmutanten von *Ephestia kühniella* und *Plodia interpunctella* ist nicht nur der Gehalt an dunklen Pigmenten, sondern auch das Muster fluoreszierender Stoffe gegenüber der Wildform verändert. Mit dem Wegfall aller Ommochrome bei der Mutante *a (rotäugig)* bei *Ephestia* wird die Menge der fluoreszierenden Stoffe erhöht (Hadorn u. Kühn 1953). Vor allem nehmen die Stoffe stark zu, die als *Pteridine* erkannt wurden (Viscontini, Kühn u. Egelhaaf 1956). Durch Zufuhr von Pigmentvorstufen in *Parabiose* von *a*- und +-Puppen wird bei *Ephestia* die Ommochrombildung in *a*-Augen ermöglicht, und je dunkler die Augen ausgefärbt werden, desto mehr sinkt die Pteridinmenge der *a*-Augen auf das Maß der +-Augen herab (Kühn 1956). Bei der *rotäugigen Mutante ra* von *Plodia* sind, wie bei *a-Ephestia*, die fluoreszierenden Stoffe gegenüber der Wildform vermehrt (de Almeida 1958b). Aber die Augen der *ra*-Puppen werden in Parabiose mit *Plodia*- oder *Ephestia*- +-Puppen nicht ausgefärbt; *ra* veranlaßt aber überraschenderweise als Parabiosepartner Ommochrombildung in *a*-Augen (de Almeida 1958a). Bei *a* wird die Ommochrombildungskette schon bei dem ersten Schritt, der Bildung von Kynurenin aus Tryptophan, blockiert. Durch Einführung von Kynurenin in *a*-Puppen wird die Ommochrombildung bewirkt (Butenandt, Weidel u. Becker 1940); und durch Homogenatversuche wurde nachgewiesen, daß bei *a* die Tryptophanoxydase fehlt (Kühn u. Egelhaaf 1958, Egelhaaf u. Caspari 1960). Bei *ra* wird die Ommochromsynthese an einer höheren Stelle unterbrochen; *ra* enthält Kynurenin und 3-Hydroxy-kynurenin (de Almeida 1961). Bei *ra* fehlt ein Gen, dessen Wirkung nicht auf humoralem Wege ersetzt werden kann und wahrscheinlich schon strukturgebunden ist, wie andere Genwirkungen der Endsynthese der Ommochrompigmente (Kühn 1956). Die Augenfarbe ist bei *ra* ein rötliches Orange. Sie entspricht im Farbton (Ostwald-Farbkörper-Tafel 6) und im Helligkeitswert orangeäugigen *Ephestia*-Stämmen (Kühn 1944). Es schien daher denkbar, daß die *ra*-Augen überhaupt kein Ommochrom enthalten und ihr Farbwert nur durch das Pterinpigment (Kühn u. Egelhaaf 1959b) bedingt wird. Dieser Frage sollte nachgegangen und das Ommochrommuster der Wildform von *Plodia* festgestellt werden. Bei der Verwendung verschiedener Extraktions- und Laufmittel ergaben die Chromatogramme auch eine größere Mannigfaltigkeit an fluoreszierenden Stoffen, als bisher bei *Ptychopoda* und *Ephestia* gefunden worden waren.

* Mit Unterstützung des „Instituto de Alta Cultura" in Lissabon.

Extrahiert wurden in Äthanol aufbewahrte Köpfe und zum Vergleich in einigen Fällen frische Köpfe ohne Vorextraktion. Zur Extraktion wurden Methanol (70%ig) oder Ameisensäure/Methanol verwendet. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte auf Papier Schleicher u. Schüll 2043b. Für die chromatographische Trennung erwies sich als besonders aufschlußreich ein Gemisch von Ameisensäure/Methanol/Salzsäure (nach Butenandt, Biekert u. Linzen 1958) im Verhältnis von 80 (85%ig):15:0,5. Bei zweidimensionalen Chromatogrammen diente in der ersten Dimension hauptsächlich dieses Gemisch, in der zweiten Dimension Na-Citrat. Dieses hat den Vorteil, daß es die Pteridine löst und gut trennt, vor allem den mengenmäßig stärksten Stoff, die c_1-Substanz[1] mit sehr hohem R_f-Wert aus dem Gebiet der übrigen fluoreszierenden Flecke, die nahe beieinanderliegen, entfernt. Ferner löst Na-Citrat die Ommochrome nicht, die daher durch HCOOH gut getrennt in der ersten Aufsteiglinie liegenbleiben (Abb. 1).

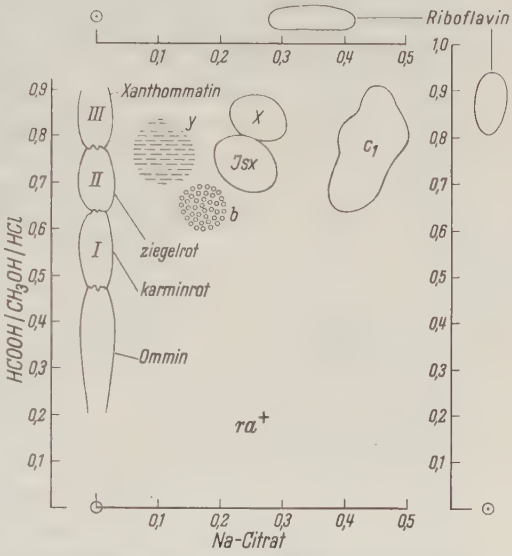


Abb. 1. Extrakt (Ameisensäure/Methanol) aus zehn Köpfen (in Äthanol aufbewahrt) der Wildform von *Plodia* (ra^+). ▤ Gelbfluoreszierend, ○○○○ orangefarbig fluoreszierend, im Tageslicht gelb. *Isx* Isoxanthopterin, *X* Xanthopterin

Nicht berücksichtigt wurde der k-Fleck (2-Amino-6-hydroxypteridin), der bei *ra* und ra^+ etwa gleich stark ausgebildet ist (de Almeida 1958b). Seine Lage ist nur in Abb. 2 eingetragen. Isoxanthopterin, Xanthopterin und das Pterin c_1 sind durch ihre Farbe und gegenseitige Lage charakterisiert. In allen

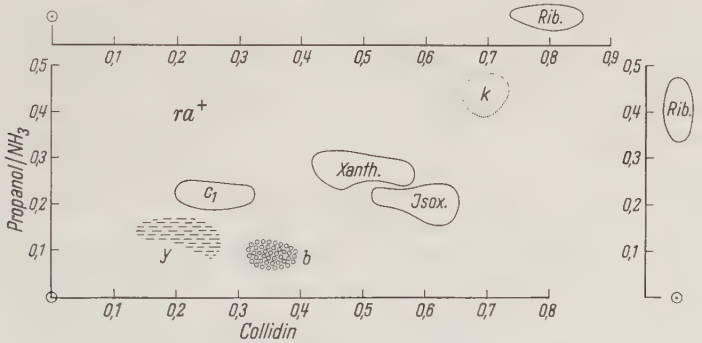


Abb. 2. Extrakt (Methanol 75%ig) aus zehn Köpfen

Chromatogrammen ist ein im Tageslicht gelber, organgefarbig fluoreszierender Fleck sehr ausgeprägt. Er entspricht dem Fleck b (in der Bezeichnungsweise von

[1] c_1 umfaßt den Stoff (ein Pteridin) der in früheren Chromatogrammen getrennt gefundenen Flecke c, e und f (Hadorn u. Kühn 1953, Kühn u. Egelhaaf 1959b).

HADORN u. KÜHN 1953). Das wird bewiesen durch Vergleichschromatogramme mit Propanol/NH_3 in der ersten und Collidin in der zweiten Dimension (Abb. 2, vgl. *Ephestia*, HADORN u. KÜHN 1953) oder in der zweiten Dimension Butanol/Essigsäure (Abb. 3, vgl. *Ephestia*, VISCONTINI, KÜHN u. EGELHAAF 1956; *Plodia*, DE ALMEIDA 1958b). Die b-Substanz kommt in vielen Schmetterlingsaugen vor, ist aber nicht so allgemein verbreitet wie Isoxanthopterin, Xanthopterin und 2-Amino-6-hydroxypteridin = „k" (GROSSBACH 1957).

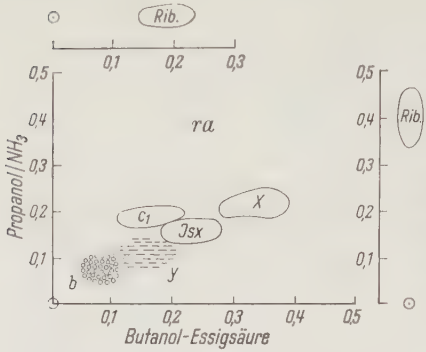


Abb. 3. Extrakt (Methanol 75 %ig) aus zehn Köpfen

Neu erscheint nach der Extraktion mit CH_3OH und mit HCOOH ein *gelb fluoreszierender Fleck*, den wir mit *y* bezeichnen. Er hat in verschiedenen Laufmitteln stets eine charakteristische Lage (Abb. 1—3). Der Fleck ist nicht auf *Plodia* beschränkt; Abb. 4 zeigt ihn auf einem Chromatogramm von *Ptychopoda-dec* (decolorata KÜHN 1939, 1940). Wir haben ihn auch bei *Ephestia* regelmäßig gefunden.

Einige Male ließen wir zum Vergleich auch Riboflavin mitlaufen (Abb. 1—3), das in Körperorganen vorkommt (EGELHAAF 1956, MÖHLMANN 1958) und auch in *Ephestia*-Köpfen in sehr geringen Mengen nachgewiesen wurde (REISENER-GLASEWALD 1956). Seine R_f-Werte unterscheiden sich von allen in unseren Kopfchromatogrammen erschienenen Flecken.

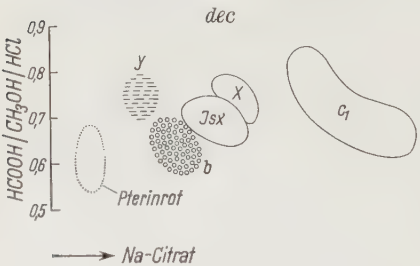


Abb. 4. Extrakt (Ameisensäure/Methanol) aus fünf Köpfen von *Ptychopoda*, Mutante *dec*, im Licht ausgefärbt (in Äthanol aufbewahrt)

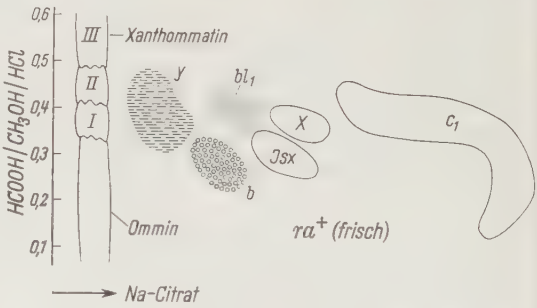


Abb. 5. Extrakt (Ameisensäure/Methanol) aus zehn frischen Köpfen

Nach Extraktion aus frischen Köpfen erscheint in der Nähe von Isoxanthopterin noch ein himmelblauer Fleck (Abb. 5; 6, bl_1).

In der Tabelle sind die R_f-Werte in dem Ameisensäuregemisch und in Na-Citrat für y, b, Isoxanthopterin, Xanthopterin und c_1 nach zweidimensionalen Chromatogrammen von *Plodia-ra*$^+$ und *ra*, *Ptychopoda-dec* (im Licht ausgefärbt, KÜHN 1939, 1940) und *Ephestia-a* angegeben. Die Köpfe waren in Äthanol aufbewahrt. Extrakte aus frischen Köpfen ergaben andere R_f-Werte, vor allem niederere in HCOOH (Abb. 5, 6).

Die Ausbildung der Flecke zeigt in den Chromatogrammen der *Plodia-Genotypen* charakteristische Unterschiede. Daß c_1, Isoxanthopterin und Xanthopterin bei *ra* in hohem Maße vermehrt sind, zeigten schon die Galvanometerwerte

der fluorometrischen Messungen (DE ALMEIDA 1958b). Für die *b-Substanz* zeigen es auch Fleckgröße und Leuchtkraft unserer Chromatogramme (Abb. 5, 6). Für den *y-Stoff* gilt das Gegenteil: er ist bei *ra*$^+$ über einen weit größeren Bereich ausgebreitet und fluoresziert stärker als bei der Mutante *ra* (Abb. 5, 6).

Der y-Stoff ist *photolabil*. Das zeigt schon ein Vergleich zwischen im Tageslicht und von der Extraktion bis zum Trocknen der Blätter in rotem Licht hergestellten Chromatogramme. Die durchschnittlichen Fluorometerwerte von jeweils drei im UV-Licht umrissenen Fleckausschnitten der ersten und der zweiten Meßgruppe verhielten sich wie 74,6:170,0, also wie 1:2,43. Bei Belichtung mit UV (365 mμ) bleicht das Gelb der y-Substanz aus, der Fleck fluoresziert milchig trüb, dann nimmt er eine himmelblaue Farbe an (Abb. 7), die dann auch verschwindet (Abb. 8).

Tabelle. *R_f-Werte der fluoreszierenden Stoffe in dem Ameisensäuregemisch und in Na-Citrat bei verschiedenen Genotypen*

Durchschnittswerte (in Klammer () die Anzahl der gemessenen Chromatogramme).

Flecke	Genotypen				Laufmittel
	ra$^+$ (8)	*ra* (8)	*dec* (5)	*a* (3)	
Gelb y	0,80	0,78	0,78	0,77	HCOOH
	0,07	0,10	0,08	0,08	Citrat
Orange b . . .	0,65	0,62	0,69	0,61	HCOOH
	0,17	0,17	0,15	0,15	Citrat
Isoxanthopterin	0,73	0,68	0,75	0,66	HCOOH
	0,17	0,19	0,15	0,22	Citrat
Xanthopterin .	0,85	0,79	0,80	0,75	HCOOH
	0,23	0,26	0,24	0,21	Citrat
c_1	0,78	0,73	0,78	0,68	HCOOH
	0,39	0,45	0,42	0,44	Citrat
Riboflavin rein	0,88	0,85			HCOOH
	0,36	0,41			Citrat

Ferner erscheint im UV-Licht auf *ra*- und *ra*$^+$-Chromatogrammen ein *neuer blauer Fleck* neben b (Abb. 7, 8 bl_2). Er überschneidet b. Die Substanz der beiden Flecke wird getrennt, wenn man ein zweidimensionales Chromatogramm wie Abb. 7 b quer durchschneidet und das b- und bl_2-enthaltende Stück um 180° gedreht in Na-Citrat laufen läßt (Abb. 9). Während b in der Laufrichtung wandert, bleibt der im UV-Licht aufgetretene blaue Fleck an seinem Ort; seine Substanz ist also im Gegensatz zu seiner nicht fluoreszierenden Vorstufe in Na-Citrat nicht löslich. Zum Vergleich sind 2-Amino-6-hydroxypteridin-8- und -9-carbonsäure mitgelaufen. Sie zeigen verhältnismäßig hohe R_f-Werte und blaue Fluoreszenz.

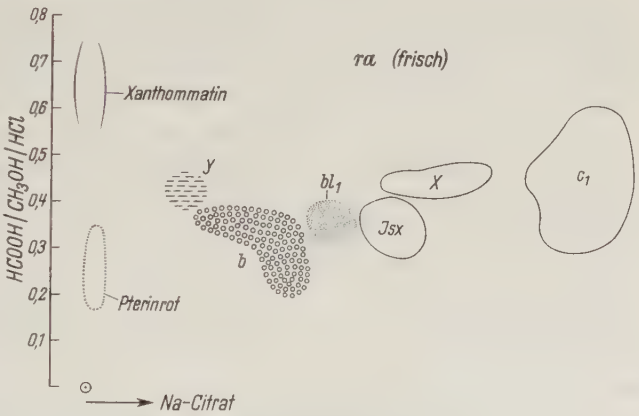


Abb. 6. Extrakt (Ameisensäure/Methanol) aus zehn frischen Köpfen der Mutante *ra*

In den zweidimensionalen Chromatogrammen der Wildform werden in der ersten Dimension die *Ommochrome* gut getrennt (Abb. 1, 5, 7). Bei *ra*$^+$ erscheinen

immer über dem violetten Ommin drei Zonen, die sich in ihrer Farbe deutlich unterscheiden: I = karminrot, II = ziegelrot, III = gelbbraun. Alle drei absorbieren im UV-Licht und zeigen das für Ommochrome charakteristische Redoxverhalten. Sie stimmen mit den bei der *Ephestia*-Mutante *br (braunäugig)* gefundenen (Kühn u. Egelhaaf 1959a) überein. Die Zone III erweist sich, wie bei *br*, als Xanthommatin. Bei *ra* tritt nur die gelbbraune Zone auf (Abb. 6). In eindimensionalen Chromatogrammen aus je 40 Köpfen (nach Auswaschen der fluoreszierenden Stoffe) liegt der gelbbraune Stoff in derselben Höhe bei *ra*, bei *br*, *ra*$^+$, *a*$^+$ und mitgelaufenem Xanthommatin. Mengenmäßig scheint bei *ra* weniger Xanthommatin vorhanden zu sein als bei *br*.

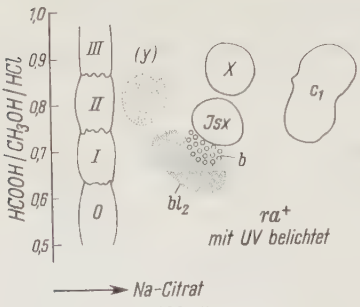


Abb. 7

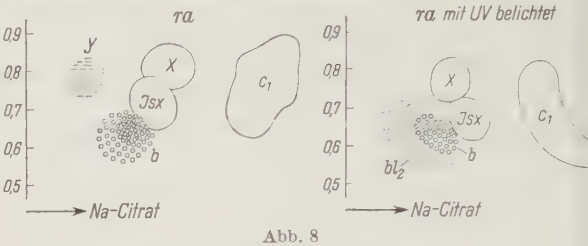


Abb. 8

Abb. 7. Extrakt (Ameisensäure/Methanol) von *ra*$^+$, mit UV bestrahlt (5 min). (*y*) lichtblau, bl_2 tiefblau

Abb. 8. Extrakte aus jeweils zehn Köpfen (Ameisensäure/Methanol) von *ra*. Erste Dimension Ameisensäure/Methanol/Salzsäure). Links in Rotlicht behandelt, rechts mit UV bestrahlt bis keine Veränderung mehr eintrat (etwa 10 min)

Wir kennen damit jetzt qualitativ *vier Ommochrommuster* in Augen von Schmetterlingsarten und Mutanten (Abb. 10). Xanthommatin scheint bei allen Insektenarten vorhanden zu sein (Butenandt, Bieckert, Kübler u. Linzen 1960) und fehlt bei Mutanten nur, wenn die Genwirkkette vor der Endsynthese unterbrochen ist, wie bei *a* durch Fehlen der Tryptophanoxydase, bei *Ephestia-wa* durch Blockierung der Ausbildung der Trägergranulen (Hanser 1948, Kühn 1956) oder durch das Fehlen eines Fermentsystems in den Granulen bei *Ptychopoda-dec* (Kühn 1939, 1940; Hanser 1948). In der Mutante *ra* von *Plodia* tritt Xanthommatin als einziger Ommochromrest auf. Bei *Ephestia-br* werden drei Ommochrome gebildet, nur das Ommin fehlt ganz. Die Wildform von *Ephestia* enthält den Stoff II nicht (oder nur so wenig, daß er sich dem chromatographischen Nachweis entzogen hat). Die Wildform von *Plodia* weist in ihren Augen das vollständige Ommochrommuster auf.

In der Genwirkkette der Ommochrombildung steht *br* jedenfalls auf einer höheren Stufe als *ra*; denn *br* erlaubt noch die Bildung eines Musters aus drei Stoffen der Ommochromgruppe, während die Kette bei *ra*, schon tiefer abgedrosselt, auf Xanthommatin beschränkt wird. Sehr deutlich drückt sich die Wirkung der Grade der Ommochromsynthese in der *Senkung der Produktion fluoreszierender Stoffe* aus. Sie geht bei dem Ommochrommuster von *br* schon so weit wie bei + (Kühn 1957, Kühn u. Egelhaaf 1959b), während *ra* mit seinem Xanthommatinrest denselben hohen Pteridingehalt hat wie *Ephestia-a* ohne alle Ommochrome (de Almeida 1958b).

Die *Rotfärbung der ra-Augen* beruht auf dem Pterinpigment (Pterorhodin, Kühn u. Egelhaaf 1959). Es wandert in Ameisensäure etwas weniger weit als b (Abb. 4, 6). Bei *ra* wird es von den roten Ommochromen verdeckt. Eindimensionale Vergleichschromatogramme von *ra*, *dec* (im Licht ausgefärbt) und *a* zeigten die Übereinstimmung in den R_f-Werten. In völlig ausgefärbten *dec*-Augen ist nach der Farbintensität der Chromatogrammflecken mehr Pterorhodin vorhanden als in *ra*-Augen. Dem entspricht auch die dunklere Rotfärbung der *dec*-Augen (gemessen mit dem Ostwaldschen Farbkörper, Maximum des Farbwerts in Kl. 7). Ob die Verschiebung des Farbwerts von Rot zu rötlichem Orange (Farbklasse 6) bei *ra* nur auf der Verminderung des Pterorhodingehalts beruht oder ob auch die Beimengung von Xanthommatin daran beteiligt ist, läßt sich nicht entscheiden; bei *br* (Klasse 5 und stärkere „Schwarzverhüllung") ist letzteres sicher der Fall.

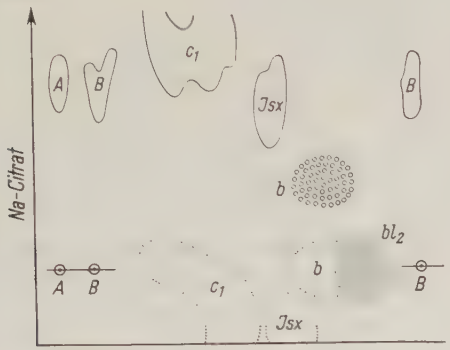


Abb. 9

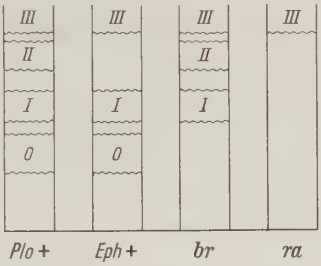


Abb. 10

Abb. 9. Chromatogramm von *ra* wie Abb. 8 rechts quer durchschnitten und um 180° gedreht gelaufen; punktiert umrissen die Lage von *b*, c_1 und Isoxanthopterin vor dem zweiten Lauf. *A* 2-Amino-6-hydroxypteridin-8-carbonsäure, *B* 2-Amino-6-hydroxypteridin-9-carbonsäure

Abb. 10. Schema der Ommochrommuster von *Plodia*-Wildform, *Ephestia*-Wildform, *Ephestia-br* und *Plodia-ra*. *O* Ommin, *III* Xanthommatin

Zusammenfassung

Die chromatographische Untersuchung hat zwei neue, durch ihre R_f-Werte und ihr Verhältnis zur Belichtung charakterisierte fluoreszierende Stoffe ergeben, einen gelbfluoreszierenden (y), der photolabil ist und beim Ausbleichen in Blau umschlägt, und einen blaufluoreszierenden, der erst bei Belichtung mit UV-Licht auftritt (bl_2).

Der y-Fleck ist bei der Wildform von *Plodia* wesentlich größer und leuchtkräftiger als bei der rotäugigen Mutante *ra*.

Die rote Augenfarbe von *ra* wird durch das von *Ptychopoda* und *Ephestia* bekannte Pterinpigment bedingt.

Bei *Plodia*-+ sind Ommin und drei andere Ommochrome im Auge vorhanden, bei *ra* nur Xanthommatin.

Die Mutation +→ *ra* greift an höherer Stelle als *a* und *cn*, aber an niederer als *br* (braunäugig *Ephestia*) in die Genwirkkette der Ommochrombildung ein.

Literatur

Almeida, F. F. de: Parabiosen zwischen verschiedenen Genotypen von *Plodia interpunctella* und *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **13**b, 617 (1958a).

Almeida, F. F. de: Über die fluoreszierenden Stoffe in den Augen dreier Genotypen von *Plodia interpunctella*. Z. Naturforsch. **13**b, 687 (1958b).

— Über die Konzentration von Kynurenin und Hydroxy-kynurenin während der Entwicklung der Genotypen *ra*$^+$ und *ra* von *Plodia interpunctella*. Naturwissenschaften **48**, 27 (1961).

Butenandt, A., E. Biekert, H. Kübler u. B. Linzen: Über Ommochrome. XX. Zur Verbreitung der Ommatine im Tierreich. Neue Methoden zu ihrer Identifizierung und quantitativen Bestimmung. Hoppe-Seylers Z. physiol Chem. **319**, 238 (1960).

— — u. B. Linzen: Über Ommochrome. XIII. Isolierung und Charakterisierung von Ommien. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **312**, 227 (1958).

Egelhaaf, A.: Die fluoreszierenden Stoffe in den Organen dreier Genotypen von *Ephestia kühniella*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 769 (1956).

— Der Gehalt an freiem Tryptophan und Kynurenin bei den Genotypen a$^+$ und a von *Ephestia kühniella* während der Entwicklung. Z. Naturforsch. **12**b, 465 (1957).

— Nachweis eines genabhängigen L-Tryptophanoxydase-Systems bei *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **13**b, 275 (1958).

—, u. E. Caspari: Über die Wirkungsweise und genetische Kontrolle des Tryptophanoxydasesystems bei *Ephestia kühniella*. Z. Vererb.-Lehre **91**, 373 (1960).

Grossbach, U.: Zur papierchromatographischen Untersuchung von Lepidopterenaugen. Z. Naturforsch. **12**b, 462 (1957).

Hadorn, E., u. A. Kühn: Chromatographische und fluorometrische Untersuchungen zur biochemischen Polyphänie von Augenfarbgenen bei *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **8**b, 582 (1953).

Hanser, G.: Über die Histogenese der Augenpigmentgranulen bei verschiedenen Rassen von *Ephestia kühniella* und *Ptychopoda seriata*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **82**, 74 (1948).

Kühn, A.: Eine durch Temperatur und durch Licht modifizierbare Augenfarbmutante von *Ptychopoda seriata*. Naturwissenschaften **27**, 787 (1939).

— Eine Mutation der Augen- und Körperpigmentierung (dec) bei *Ptychopoda seriata*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **78**, 1 (1940).

— Versuche zur Entwicklung eines Modells der Genwirkungen. Naturwissenschaften **43**, 25 (1956).

— Eine neue Mutation in der Ommochrombildungskette bei *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **12**b, 728 (1957).

—, u. A. Egelhaaf: Zur biochemischen Polyphänie bei *Ephestia kühniella*. Naturwissenschaften **42**, 634 (1955).

— — The action of the mutation *a* in *Ephestia kühniella* on the formation of kynurenin from tryptophan. Proc. X. Internat. Congr. Genetics, p. 152, 1958.

— — Über die Mutation *br* (braunäugig) bei *Ephestia kühniella*. Z. Vererb.-Lehre **90**, 244 (1959a).

— — Der rote Augenfarbstoff von *Ephestia* und *Ptychopoda*, ein Pterinpigment. Z. Naturforsch. **14**b, 654 (1959b).

Möhlmann, Elisabeth: Chromatographische Untersuchungen an verschiedenen Genotypen von *Plodia interpunctella* im Vergleich mit anderen Schmetterlingsarten. Z. Vererb.-Lehre **89** (1958).

Reisener-Glasewald, Eveline: Die Entwicklung des Bestandes an fluoreszierenden Stoffen in den Köpfen von *Ephestia kühniella*, in Abhängigkeit von verschiedenen Augenfarbgenen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 668 (1956).

Viscontini, M., A. Kühn u. A. Egelhaaf: Isolierung fluoreszierender Stoffe aus *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **11**b, 501 (1956).

Professor Dr. Alfred Kühn,
Max Planck-Institut für Biologie, Tübingen, Spemannstr. 34

Zeitschrift für Vererbungslehre 92, 133—141 (1961)

Aus der Abteilung für Mikrobiologie, Botanisches Institut der Universität zu Köln
und dem Institut für Mikrobiologie der Universität zu Frankfurt a. M.

ZUR FRAGE EINES ADDITIVEN MASSES VON GEN-ABSTÄNDEN IN KREUZUNGEN MIT DEM BAKTERIOPHAGEN T1*

Von

Horst-Dieter Mennigmann

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. März 1961)

Bei dem Bakteriophagen T1 des Bakterienwirtes E. coli B kann man auf den „Zweifarb-Nährböden" (Bresch u. Trautner 1956) eine Reihe von Mutanten mit charakteristischer Loch-Färbung unterscheiden, mit deren Hilfe durch Zwei- und Drei-Faktor-Kreuzungen die Reihenfolge und die ungefähren relativen Abstände einiger Gene auf dem Phagen-Genom bestimmt worden sind (Bresch u. Mennigmann 1954). In der vorliegenden Arbeit soll in Fortführung dieser Experimente über weitere Kreuzungen mit dem Phagen T1 berichtet werden.

Material und Technik

Die in dieser Arbeit benutzten Mutanten des Phagen T1 sind in ihren Eigenschaften bereits früher (Bresch u. Mennigmann 1954) beschrieben worden.

Als Bakterien wurden die Stämme B und B/1 von E. coli benutzt.

Für eine Serie von Kreuzungen wurden Proben derselben wachsenden Kultur von E. coli B mit dem jeweiligen Mischlysat (Verhältnis der beiden Parentaltypen 1:1) gemischt, so daß die Konzentration der Bakterien etwa 3×10^7/ml und die jedes Phagentyps 40×10^7/ml betrug. Nach einer Adsorptionszeit von 5 min bei 37° C wurde jede Kreuzungsmischung mit Bouillon um den Faktor 10^{-4} verdünnt, um Nachinfektionen zu vermeiden, und nach weiteren 45 min bei 37° C in geeigneter Verdünnung auf Platten gebracht.

Die jeweils parallel dazu angelegte Kreuzung zur Adsorptionsmessung wurde nach 5 min Adsorptionszeit um den Faktor 10^{-2} mit Bouillon verdünnt. Anschließend wurden die freien Phagen mit Anti-T1-Serum inaktiviert, so daß, wenn nach weiterer Verdünnung die Mischung auf Platten gebracht wurde, nur noch die tatsächlich infizierten Bakterien Löcher bildeten.

Nährboden und Nährbouillon wurden bereits früher beschrieben (Bresch u. Trautner 1956).

Experimente

Es wurden eine Anzahl von Zwei-Faktor-Kreuzungen (2FK) und Drei-Faktor-Kreuzungen (3FK) durchgeführt, bei denen sechs der bekannten Merkmale von T1 beteiligt waren. Ihre Reihenfolge ist aus einer früheren Arbeit (Bresch u. Mennigmann 1954) bekannt: Rm—Vs—Ge—Hr—Fk—Sb.

Zwei-Faktor-Kreuzungen

Zunächst wurden zwei Gruppen von 2FK angelegt. Der ständige Parentaltyp der einen Gruppe trug das Merkmal Rm und der der anderen Sb; denn sie begrenzten das (zur Zeit der Versuche) bekannte Stück des Genoms von T1.

* Versuchsdaten dieser Arbeit stammen aus einer Dissertation an der Universität zu Göttingen.

Jeder dieser Typen wurden mit den übrigen fünf gekreuzt, die jeder jeweils eines der fünf anderen Merkmale trugen, so daß jede Gruppe aus fünf verschiedenen Kreuzungen bestand:

Gruppe I: (1) Rm × Vs
(2) Rm × Ge
(3) Rm × Hr
(4) Rm × Fk
(5) Rm × Sb

Gruppe II: (6) Sb × Rm
(7) Sb × Vs
(8) Sb × Ge
(9) Sb × Hr
(10) Sb × Fk

Jede einzelne Kreuzung wurde dreimal durchgeführt (Bezeichnung a, b und c in Tabelle 1). Sämtliche Nachkommen-Typen konnten identifiziert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. *Rekombinanten-Prozentsätze aus Zwei-Faktor-Kreuzungen*

Lfd. Nr.	Eltern: Kreuzung 11 × 22	Eltern: Mittlere Infektionszahl je Typ	Nachkommenschaft (Verdünnungsfaktor $^1/_6 \times 10^7$): Parentaltypen 11	Parentaltypen 22	Rekombinanten 12	Rekombinanten 21	korrigierter Rekombinanten-Prozentsatz (vgl. Text)	Mittelwerte der korrigierten Rekombinanten-Prozentsätze
			Gruppe I					
1a	Rm+ × +Vs	3,11	1581	1475	13	16	1,36	
b		2,23	1665	1642	14	15	1,43	
c		3,00	1493	1365	9	14	1,17	1,32
2a	Rm+ × +Ge	3,23	1532	1583	47	55	4,52	
b		2,31	1620	1579	46	46	4,55	
c		3,11	1546	1249	52	58	5,53	4,87
3a	Rm+ × +Hr	2,72	1823	1658	109	104	8,37	
b		1,95	1695	1592	81	76	7,90	
c		2,62	1094	908	70	75	10,72	9,00
4a	Rm+ × +Fk	2,61	2078	1863	106	111	7,58	
b		1,87	1798	1703	101	99	9,48	
c		2,51	1318	1210	90	93	10,44	9,17
5a	Rm+ × +Sb	3,00	1835	2663	157	173	9,43	
b		2,15	1861	1912	104	107	8,63	
c		2,88	1280	1593	112	122	11,02	9,69
			Gruppe II					
6a	Sb+ × +Rm	2,55	870	838	46	58	10,00	
b		2,46	1466	1333	79	89	9,01	
c		2,19	1366	1168	66	98	10,48	9,83
7a	Sb+ × +Vs	2,27	956	882	46	55	9,12	
b		2,19	1298	1215	69	71	8,89	
c		1,95	1027	841	54	61	11,14	9,72
8a	Sb+ × +Ge	2,16	729	641	31	36	8,97	
b		2,08	1533	1332	69	77	8,18	
c		1,86	895	706	42	50	11,04	9,40
9a	Sb+ × +Hr	2,34	865	822	26	33	6,03	
b		2,25	1056	1247	55	52	7,53	
c		2,01	1165	921	47	45	7,84	7,13
10a	Sb+ × +Fk	2,59	842	870	16	20	3,63	
b		2,50	1444	1587	38	41	4,00	
c		2,23	1040	1142	26	34	4,77	4,13

Drei-Faktor-Kreuzungen

Bei der Auswahl der 3FK wurde darauf geachtet, daß die bei einer Kreuzung beteiligten Merkmale möglichst nahe benachbart sind. Zusätzlich zu den sich ergebenden vier Kreuzungen wurde noch eine weitere angelegt, bei der die beiden die ganze Kopplungsgruppe begrenzenden Merkmale Rm und Sb beteiligt sind. Es wurden also folgende fünf 3FK durchgeführt:

Gruppe III: (11) Rm × Ge Hr
(12) Vs × Ge Hr
(13) Ge Hr × Fk
(14) Hr × Fk Sb
(15) Rm Sb × Hr

Die dabei benutzten Doppelmutanten wurden aus 2FK gewonnen. Die Auswahl, welche beiden Merkmale in einer 3FK in einem der beiden Parentaltypen gemeinsam vertreten waren, ist willkürlich gewesen.

Auch hier konnten die acht verschiedenen Merkmal-Kombinationen in der Nachkommenschaft identifiziert werden. Jede einzelne Kreuzung wurde dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Bevor die Ergebnisse der Tabelle 1 und 2 diskutiert werden können, ist es erforderlich, die Versuchszahlen zu korrigieren; denn es ist auch unter veränderten Versuchsbedingungen nicht möglich gewesen, den Prozentsatz der adsorbierten Phagen (10—20%) zu erhöhen, so daß man die verbliebenen freien Phagen subtrahieren muß.

Diese freien Phagen konnten leider nicht in jeder einzelnen Kreuzung mit Anti-T1-Serum abgetötet werden, weil dieses nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand. (Der Phage T1 ist ein sehr schlechtes Antigen.) Da gezeigt werden konnte, daß alle Mutanten annähernd gleich gut adsorbieren, wurde in einer eigens dazu bestimmten Kreuzung die jeweilige mittlere Infektionszahl ermittelt, der Wert auf die parallel dazu angelegte Kreuzungsserie übertragen und deren Ergebnisse für nicht adsorbierte Phagen korrigiert.

Da die mittlere Infektionszahl recht niedrig war, mußte außerdem berücksichtigt werden, daß aus statistischen Gründen ein Teil der Bakterien nur von einem Typ infiziert worden ist und daß selbst in den mischinfizierten Zellen das Verhältnis der Infektionszahlen für die beiden Parentaltypen im Mittel zwar gleich, in den einzelnen Zellen jedoch unterschiedlich ist. Der mathematische Ausdruck für den entsprechenden Korrektionsfaktor wurde einer Arbeit von Lennox, Levinthal und Smith (1953) entnommen.

Dadurch erhält man die in den Tabellen 1 und 2 aufgeführten korrigierten Rekombinanten-Prozentsätze.

Diskussion

Zwei-Faktor-Kreuzungen

Trägt man die Mittelwerte der korrigierten Rekombinanten-Prozentsätze aus den jeweils parallelen 2FK (Tabelle 1) auf in Abhängigkeit von den Abständen der jeweiligen Gen-Paare (diese wurden aus 3FK ermittelt, s. unten), so erhält man eine Sättigungskurve (Abb. 1, das in der jeweiligen Gruppe ständig benutzte Merkmal wurde in beiden Fällen in den Nullpunkt gelegt). Wie man sieht, liefern die Gen-Paare Rm Hr, Rm Fk, Rm Sb (aus Gruppe I) und Sb Ge,

Tabelle 2. *Rekombinanten-Prozentsätze aus Drei-Faktor-Kreuzungen*

Im Gegensatz zu den ZFK sind hier die mittleren Infektionszahlen für die parallel durchgeführten Kreuzungen gleich, da hier alle fünf Kreuzungsmischungen denselben Titer hatten. Mittlere Infektionszahl je Typ: a 2,56, b 2,66, c 1,99.

Lfd. Nr.	Eltern	Nachkommenschaft (Verdünnungsfaktor für a 5×10^5, für b und c $^2/_3 \times 10^6$)													
	Kreuzung	Parentaltypen		Rekombinanten						korrigierte Rekombinanten-Prozentsätze (vgl. Text)			Mittelwerte der korrigierten Rekombinanten-Prozentsätze		
	111 × 222	111	222	211	122	121	212	112	221	211+122	121+212	112+221	211+122	121+212	112+221
							Gruppe III								
11a	Rm++ × +GeHr	4772	4987	172	159	28	25	89	79	4,921	0,788	2,498			
b		3017	3208	98	78	14	19	62	52	4,240	0,795	2,746			
c		4598	4323	138	120	28	33	96	81	4,675	1,105	3,207	4,612	0,896	2,817
12a	Vs++ × +GeHr	4498	4859	119	101	20	21	87	77	3,474	0,647	2,590			
b		2283	2591	58	45	12	9	40	34	3,395	0,692	2,439			
c		3702	3960	75	68	14	16	62	70	3,130	0,657	2,890	3,333	0,665	2,640
13a	GeHr+ × ++Fk	5063	4851	79	79	10	14	51	66	1,375	0,361	1,759			
b		2268	2359	42	36	5	4	23	32	2,782	0,321	1,962			
c		4987	4800	79	71	8	11	51	59	2,523	0,320	1,850	2,227	0,334	1,857
14a	Hr++ × +FkSb	5461	5083	58	46	15	11	93	84	1,459	0,365	2,483			
b		3698	3354	42	35	9	11	69	73	1,634	0,424	3,013			
c		4733	4229	68	49	15	15	101	112	2,144	0,550	3,903	1,746	0,446	3,133
15a	Rm+Sb × + Hr+	5157	4956	162	155	50	56	107	91	4,502	1,505	2,812			
b		3602	3655	101	85	43	32	74	75	3,962	1,597	3,174			
c		4104	4673	137	141	39	54	99	122	5,066	1,695	4,028	4,510	1,599	3,338

Sb Vs, Sb Rm (aus Gruppe II) einen offenbar nicht überschreitbaren maximalen Rekombinanten-Prozentsatz. Solche Gen-Paare werden meist als „ungekoppelt" bezeichnet. Sie wurden auch bei anderen Phagen beobachtet (T2: Hershey u. Rotman 1948); T4: Doermann u. Hill 1952; λ: Kaiser 1955).

Wären die zu einem Gen-Austausch führenden Brüche über das Genom zufallsverteilt (d. h. keine Interferenz, Koinzidenz-Faktor $C = 1$) und würden bei einer „Kooperation" (Bresch 1959) nur zwei Genome beteiligt sein ($Q = 2$; die Größe Q ist ein Maß für die „Vollständigkeit der Kooperation"), so würde der Sättigungswert bedeuten, daß die Wahrscheinlichkeit für eine gerade Anzahl

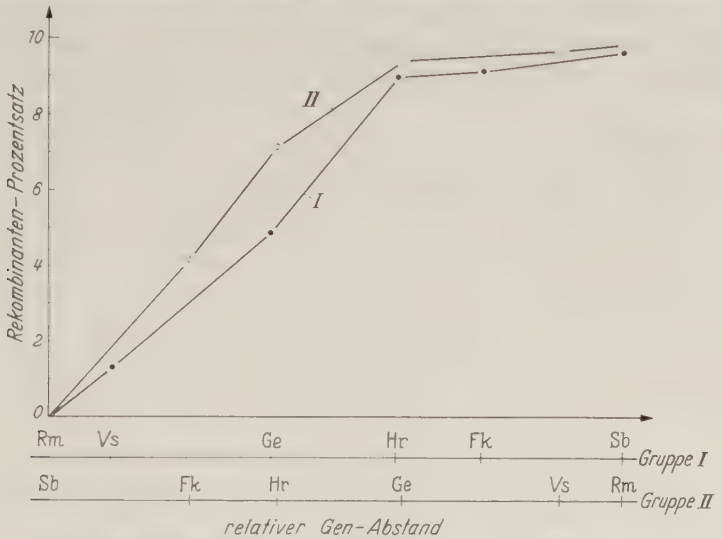


Abb. 1. Sättigungskurve für die Rekombinanten-Prozentsätze aus 2FK

von Brüchen ebensogroß ist wie die für eine ungerade Anzahl (das hieße, die Kopplungsstärke p wäre gleich 0,5). Unter obiger Voraussetzung ($C = 1$, $Q = 2$) wäre das exakt erst bei unendlich großem Gen-Abstand der Fall; in guter Annäherung trifft das jedoch bereits für einen Abstand mit einer mittleren Bruchzahl von 2 zu (Mennigmann 1955). Zu obiger Schlußfolgerung — für ungekoppelte Gene $p = 0{,}5$ — würde man auf Grund der Rekombinationstheorie in ihrer speziellen Form von Visconti u. Delbrück (1953) kommen. Es konnte jedoch gezeigt werden (Chase u. Doermann 1958, Edgar u. Steinberg 1958), daß durch das Auftreten eines Bruches die Wahrscheinlichkeit für einen weiteren in Nachbarschaft des ersten erhöht wird („negative Interferenz", $C > 1$). Außerdem können bei einer Kooperation vermutlich auch mehr als zwei Genome beteiligt sein (nach vorläufigen und unveröffentlichten Experimenten von Bode an T4 liegt der Wert für Q zwischen 1,4 und 1,7). Darum kann man allein aus der Sättigung für keine der drei Größen p, C und Q, sondern lediglich in Kreuzungen mit „ungekoppelten" Merkmalen für ihr Produkt einen numerischen Wert ableiten (Bresch 1959):

$$p_{\mathrm{sat}} \cdot (QC)_{\mathrm{sat}} = 1 \qquad (1)$$

Da Q keine Konstante für ein bestimmtes Phagen-Wirt-System ist, sondern genau wie C eine von dem beteiligten Gen-Triplett abhängige Variable (deren

Funktion ebenso unbekannt ist wie die für C), kann man aus der Gleichung nur folgern, daß bei Erreichung des Sättigungswertes das *Verhältnis* aus geraden und ungeraden Bruchzahlen *konstant* wird, und man sieht, daß nur für den oben erwähnten Spezialfall ($C=1$, $Q=2$) $p_{sat}=0{,}5$ wäre.

Wenn auch der Sättigungswert keine Aussage erlaubt über die Größe von p, so zeigt sein Vorkommen doch, daß Mehrfach-Brüche in der einzelnen Kooperation auftreten können.

Drei-Faktor-Kreuzungen

Da die Gene auch bei Phagen linear angeordnet sind, erhebt sich die Frage nach einem additiven Abstandmaß.

Von den Rekombinanten-Prozentsätzen kann man wegen des Vorkommens von Mehrfach-Brüchen, genau wie bei den höheren Organismen, keine Additivi-

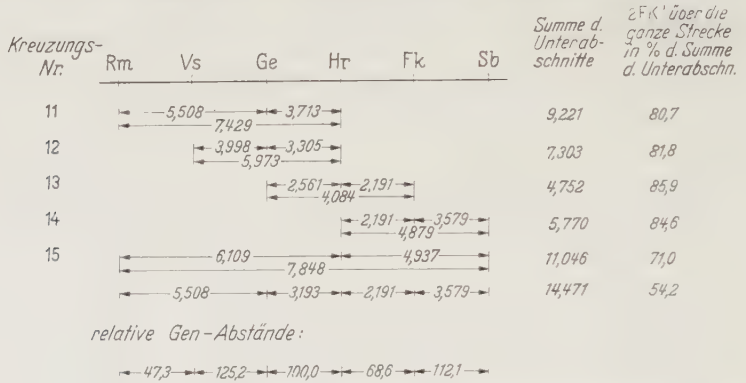


Abb. 2. Rekombinanten-Prozentsätze als additives Abstandsmaß (Erklärung s. Text)

tät erwarten. Die Stärke der Abweichung kann man innerhalb einer jeden 3FK untersuchen, indem man diese als drei 2FK auffaßt. Die entsprechenden Umrechnungsergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt. Wie man sieht, beträgt der Rekombinanten-Prozentsatz für die ganze Strecke bei Abständen von der hier betrachteten Größenordnung 70—86% der Summe aus den Unterabschnitten. Summiert man alle Unterabschnitte des ganzen betrachteten Genom-Stückes, so beträgt die Abweichung 54% (vorletzte Zeile in Abb. 2).

Eine Additivität ist von den Rekombinanten-Prozentsätzen aber auch deshalb nicht zu erwarten, weil darin die speziellen populationsgenetischen Geschehnisse bei Phagen noch gar nicht berücksichtigt sind. Das wäre zwar bei der Kopplungsstärke p der Fall; sie kann jedoch nicht getrennt von den anderen Größen berechnet werden. Wegen der symmetrischen Infektion (d. h. beide Parentaltypen gleich häufig) bei den 3FK kann unter Berücksichtigung einer konstanten Reifungsrate die Gl. (*A* 4) aus dem Anhang zu einer Arbeit von HAUSMANN u. BRESCH (1960) in der vereinfachten Form

$$b_{ijk} = A + B_i E_i + B_k E_k + B_j E_j \qquad (2)$$

angewendet werden. Darin sind B_i, B_k und B_j Größen, die sich aus dem Verhältnis der zugegebenen Elternphagen errechnen lassen und die für symmetrische Infektion den Wert 1/8 haben. b_{ijk} ist der allgemeine Ausdruck für die Anteile der einzelnen Merkmalkombinationen in der Nachkommenschaft und

kann aus den experimentellen Daten gewonnen werden. E_i, E_k und E_j sind Funktionen eines allgemeinen Typs von Mp_I, Mp_{II}, C/M und Q (M ist ein Maß für die Kooperationserfahrung):

$$E_i = f(Mp_{II}) \tag{3a}$$
$$E_k = f(Mp_I) \tag{3b}$$
$$E_j = f(Mp_{II} + Mp_I - Mp_I Mp_{II} \cdot CQ/M) \tag{3c}$$

Daraus ersieht man, daß sich die Kopplungsstärke p von M nicht trennen läßt. Jedoch ist M eine Konstante, so daß das Produkt Mp auf Additivität geprüft werden kann. Da in diesen Mp-Werten bereits die Reifung und die Populationsgenetik berücksichtigt sind, könnte man erwarten, daß sie besser additiv sind als die Rekombinanten-Prozentsätze. Das ist aber, wie Abb. 3 zeigt, nicht der Fall.

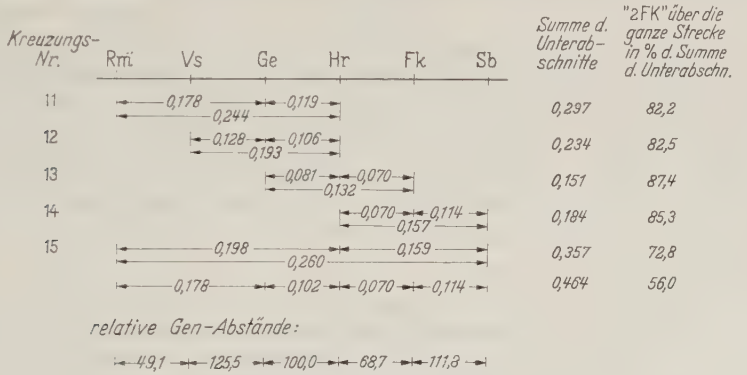


Abb. 3. Mp-Werte als Abstandsmaß (Erklärungen vgl. Text)

Ob die Zahl der Brüche, die im Mittel zwischen zwei Genen vorkommen, ein additives Abstandsmaß darstellt, kann nicht geprüft werden, solange man nichts über das Ausmaß und den Charakter der Interferenz aussagen kann. Zwar kann man für den Fall, daß keine Interferenz wirksam ist, einen mathematischen Zusammenhang finden zwischen p und der mittleren Bruchzahl s (Mennigmann 1955). Da jedoch die entsprechende Funktion nicht linear ist [$s_{ik} = -1/2 \ln (1-2p_{ik})$], kann man hier nicht das dem p proportionale Produkt Mp benutzen.

Es stellen also weder die Rekombinanten-Prozentsätze noch die Mp-Werte ein tatsächlich additives Abstandmaß dar. Doch ist zum einen die Abweichung von der Additivität so geartet, wie man sie auf Grund des Vorkommens von Mehrfachbrüchen erwarten sollte: 1. Die Summe der Werte für Unterabschnitte ist größer als der Wert für den ganzen Abschnitt. 2. Je größer der ganze Abschnitt ist bzw. in je mehr Unterabschnitte er unterteilt ist, um so größer ist die Abweichung von der Additivität. Zum anderen ist die Abweichung nicht sehr groß und schwankt zwischen den einzelnen 3FK nicht so erheblich, als daß man nicht doch die Werte für die kleinsten Abschnitte (d. h. die Unterabschnitte aus jeder 3FK) als gut angenähertes Abstandsmaß benutzen könnte. Da man unter anderen Versuchsbedingungen andere Größen für die Rekombinanten-Prozentsätze ein und derselben 3FK (Trautner 1960) und damit auch andere

Mp-Werte erwarten kann, ist wegen der leichten Unterscheidbarkeit der Merkmale Ge und Hr der hundertste Teil dieses Abstandes als Einheit für den Gen-Abstand gesetzt worden. Durch entsprechende Umrechnung der Rekombinanten-Prozentsätze bzw. *Mp*-Werte erhält man die in der untersten Zeile der Abb. 2 bzw. 3 wiedergegebenen Gen-Abstände in Abstands„einheiten". In Abb. 4 sind die Abstände für die hier untersuchten Gene graphisch wiedergegeben.

Abb. 4. Gen-Karte der Phagen T1

Wenn man auch, wie gesagt, über das Ausmaß der Interferenz nichts aussagen kann, so könnte man doch unter Umständen anhand der Unterschiede in den Ausdrücken CQ/M der einzelnen 3FK einen Anhaltspunkt über die Veränderungen der Interferenz mit größer werdendem Gen-Abstand gewinnen. Dieses CQ/M kann man für jede 3FK ausrechnen, indem man in Gl. (3c) für Mp_{II} und Mp_I die aus Gl. (3a) bzw. (3b) gefundenen Werte einsetzt. Wenn mit größer werdendem Gen-Abstand die Stärke der Interferenz nachläßt (C gegen 1), dann sollte der Ausdruck CQ/M kleiner werden.

Tabelle 3. *Werte für CQ/M*

Kreuzungs-Nr.	$Mp_I + Mp_{II}$	CQ/M
13	0,151	3,35
14	0,184	3,38
12	0,234	3,03
11	0,297	2,50
15	0,357	3,08

Die Ergebnisse solcher Umrechnungen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt und nach der Größe des in der einzelnen 3FK beteiligten Gesamtabschnittes (aus der Summe der Unterabschnitte) geordnet. Wie man sieht, nehmen die Werte für größer werdenden Gen-Abstand in den Kreuzungen 11—14 tatsächlich ab. Jedoch paßt der Wert für Kreuzung 15 nicht in dieses Schema. Außerdem unterscheiden sich der größte und der kleinste Wert nur um den Faktor 1,35. Unterschiede von dieser Größe erlauben noch nicht, daraus bereits auf negative Interferenz zu schließen; denn auch Q könnte mit größer werdendem Gen-Abstand kleiner werden, allerdings höchstens um den Faktor 2 ($2 > Q > 1$). Es kann darum aus den Unterschieden der Werte für CQ/M nur herausgelesen werden, daß, wenn Interferenz wirksam sein sollte, die Veränderungen in der Interferenzstärke in dem untersuchten Genom-Abschnitt gering sind. Darüber hinaus könnte man vielleicht sogar vermuten, daß die Interferenz auf Gen-Abstände von der hier betrachteten Größenordnung nur noch geringen Einfluß hat (C nahe an 1). Einerseits sind nämlich die Gen-Abstände, bei denen man hohe negative Interferenz ($C > 1$) beobachtet hat (CHASE u. DOERMANN 1958; EDGAR u. STEINBERG 1958), sehr klein im Vergleich zu den hier untersuchten, und andererseits unterscheidet sich der kleinste Gen-Abstand von dem größten um einen Faktor von etwa 3, die CQ/M-Werte jedoch nur um den Faktor 1,35.

Zusammenfassung

1. Durch Zwei-Faktor-Kreuzungen mit größer werdendem Gen-Abstand konnte gezeigt werden, daß es auch für den Phagen T1 einen maximalen Rekombinanten-Prozentsatz gibt. Daraus wurde geschlossen, daß, wie bei den

höheren Organismen, zwischen zwei Genen mehr als ein Bruch vorkommen kann.

2. Anhand einer Anzahl von 3FK wurden verschiedene Parameter auf ihre Brauchbarkeit als relatives additives Abstandsmaß geprüft und eine Gen-Karte für die sechs untersuchten Gene aufgestellt.

3. Das Ausmaß der Interferenz in einer Kooperation (Prozeß der Rekombinanten-Bildung) kann nicht angegeben werden. Jedoch ist die Veränderung der Interferenzstärke bei Gen-Abständen von der hier untersuchten Größenordnung gering.

Herrn Prof. Bresch sei für die Überlassung des Themas und ihm sowie Herrn Prof. Delbrück für viele anregende Diskussionen gedankt. Diese Arbeit wurde durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft an Herrn Prof. Bresch unterstützt.

Literatur

Bresch, C.: Recombination in bacteriophage. Ann. Rev. Microbiol. **13**, 313 (1959).

—, u. H. D. Mennigmann: Weitere Untersuchungen zur Genetik von T1-Bakteriophagen. Z. Naturforsch. **10**b, 436 (1955).

—, u. T. Trautner: Die Bedeutung des Zweifarb-Nährbodens für genetische Untersuchungen am Bakteriophagen T1. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 590 (1956).

Chase, M., and A. H. Doermann: High negative interference over short segments of the genetic structure of bacteriophage T4. Genetics **43**, 332 (1958).

Doermann, A. H., and M. B. Hill: The arrangement of genetic loci in bacteriophage T4. Genetics **37**, 577 (1952).

Edgar, R. S., and C. M. Steinberg: On the origin of high negative interference over short segments of the genetic structure of bacteriophage T4. Virology **6**, 115 (1958).

Hausmann, R., u. C. Bresch: Zum Problem der genetischen Rekombination von Bakteriophagen. II. Versuch einer experimentellen Unterscheidung von paarweiser und kompletter Kooperation. Z. Vererb.-Lehre **91**, 266 (1960).

Hershey, A. D., and R. Rotman: Linkage among genes controlling inhibition of lysis in a bacterial cell. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **34**, 89 (1948).

Kaiser, A. D.: A genetic study of the temperate coliphage λ. Virology **1**, 424 (1955).

Lennox, E. S., C. Levinthal and F. Smith: The effects of finite input in reducing recombinant frequency. Genetics **38**, 508 (1953).

Mennigmann, H. D.: Zur Genetik des Bakteriophagen T1. Diss. an der Universität Göttingen 1955.

Trautner, T. A.: The influence of the multiplicity of infection on crosses with bacteriophage T1. Z. Vererb.-Lehre **91**, 259 (1960).

Visconti, N., and M. Delbrück: The mechanism of genetic recombination in phage. Genetics **38**, 5 (1953).

Horst-Dieter Mennigmann, zur Zeit McArdle Memorial Laboratory, The Medical School, The University of Wisconsin, Madison/Wisc.

Zeitschrift für Vererbungslehre 92, 142—164 (1961)

Aus dem Institut für Entwicklungsphysiologie, Universität zu Köln

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GONENKONKURRENZ BEI *OENOTHERA* UNTER VERWENDUNG DER TESTLOCI *fr*, *s* UND *de**

Von

CORNELIA HARTE

(Eingegangen am 9. Mai 1961)

A. Einleitung

Es ist bereits seit längerem bekannt, daß bei *Oenothera* in Bastardnachkommenschaften die Spaltungszahlen für Blütenfarbe (Gegensatz gelb: *sulfurea*), Antherenentwicklung (fertil: pollensteril) und Form des Sproßgipfels (spitz: flach) wesentlich von der Erwartung einer monohybriden Spaltung abweichen können. Als Erklärung hierfür wurde eine Konkurrenz zwischen den Pollenschläuchen bzw. in der Samenanlage zwischen den Makrosporen verschiedener genetischer Konstitution angenommen (zuletzt HARTE 1953). Es ist aber noch eine offene Frage, ob diese Loci direkt auf das Wachstum der haploiden Generation (Pollenschlauch und Embryosack) einwirken oder ob sie nur Testloci sind, an deren Verhalten die Wirkung anderer Gene derselben Koppelungsgruppe abgelesen werden kann. Eine Entscheidung über diesen Punkt ist von besonderem Interesse. Es geht darum, ob ein Genlocus in verschiedenen Entwicklungsstadien, hier der diploiden und der haploiden Generation einer höheren Pflanze, verschiedene Entwicklungsvorgänge beeinflussen kann. Im gegebenen Fall sind dies die Ausbildung eines sporophytischen Merkmals und die Wachstumsgeschwindigkeit des Gametophyten. Die Alternative wäre, daß hierfür die Wirkung verschiedener Genloci angenommen werden muß. Zum gleichen Problemkreis gehört die Frage, ob die Entwicklungsvorgänge, die zum Auftreten der Gonenkonkurrenz führen, im Pollenschlauch und im Embryosack von den gleichen Genloci abhängig sind und in gleicher Weise gesteuert werden oder ob beim ♀ und ♂ Gametophyten verschiedene Wirkungsmechanismen zum gleichen Ergebnis führen. Um diesen Fragen näherzutreten, wurden eine Reihe von Kreuzungsserien angesetzt, deren Ergebnisse im folgenden beschrieben werden sollen.

B. Material und Methode

Die für die Kreuzungen verwendeten Arten wurden seit vielen Generationen durch Selbstung erhalten. Die Bastarde sind, soweit nicht ausdrücklich anders angegeben, immer F_1-Generationen, die durch Kreuzung der Eltern erhalten wurden. Die F_1-Pflanzen wurden mit den Elternformen oder mit geeigneten Homozygoten rückgekreuzt. Aus äußeren Ursachen mußte die Aufzucht einzelner Rückkreuzungsnachkommenschaften über mehrere Jahre verteilt werden. Bei der weiteren Bearbeitung wurden diese zusammengehörenden Gruppen vereinigt, nachdem vorher jeweils die Homogenität der Ergebnisse geprüft war. Für die cytologischen Untersuchungen erfolgte die Fixierung junger Knospen in Alkohol-Eisessig 3:1, wobei für jede Pflanze ein numeriertes Fixierglässchen verwendet wurde. Färbung mit Karminessigsäure mit Fe-Zusatz, Verarbeitung als Quetschpräparate. Optik: Zeiss-Standard-Mikroskop Okular 12,5×, Ölimmersion 100×.

* Frau Prof. Dr. ELISABETH SCHIEMANN zum 80. Geburtstag gewidmet.

C. Versuchsergebnisse

1. Kreuzungen von Hookeri-ähnlichen Komplexen mit Oenothera strigosa

Als erstes sollen die Nachkommenschaften von Kreuzungen zwischen *stringens*, dem Pollenkomplex der *Oe. strigosa* und *^{h}Hookeri*-ähnlichen Komplexen beschrieben werden. Alle *^{h}Hookeri*-ähnlichen Komplexe enthalten die Allele $+^s$ $+^{fr}$, stringens $+^s$ *fr*. Beide Loci liegen in allen Bastarden dieser Gruppe in einem Viererring mit den Chromosomenenden 1 – 2 3 4 (^{h}Hookeri 1·2, 3·4; stringens 1·4, 2·3). Als Testloci stehen demnach *fr* und der Translokationspunkt zur Verfügung.

Für die Prüfung der Spaltung in den Eizellen wurden die Bastarde mit Pollen von *Oe. strigosa* rückgekreuzt. Zur Untersuchung der Pollennachkommenschaften diente die Rückkreuzung von Bastardpollen auf Griffel pollensteriler Pflanzen der Konstitution *fr*/*fr*, die aus verschiedenen Kreuzungen stammten. Die Zahlen für die Bastarde mit *Oe. Lamarckiana*, *Hall* und *Hookeri* stammen jeweils aus mehreren getrennten Aufzuchten. Vor der Zusammenfassung wurde die Homogenität zwischen ihnen geprüft. Der χ^2-Test ergab immer $P>0{,}1$, so daß einer gemeinsamen Auswertung nichts im Wege steht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Immer überwiegen die pollenfertilen Pflanzen. Es zeigt sich, daß die Pollennachkommenschaften der vier verschiedenen Bastarde unter sich homogen sind, ebenso die vier Eizellennachkommenschaften. Zwischen diesen beiden Gruppen besteht ebenfalls völlige Übereinstimmung, nicht nur in der Gesamtauswertung, sondern auch, wenn der Test für jeden der drei Bastarde, für die beide Vergleichsgruppen vorhanden sind, getrennt erfolgt.

Eine Prüfung der Anzahl der tauben Samen in den Rückkreuzungsgenerationen ergab immer sehr niedrige Werte, so daß mit Sicherheit angenommen werden kann, daß die Ergebzisse nicht durch selektive Ausfälle in einzelnen Klassen infolge embryonaler Letalität verzerrt sind.

Diese Bastarde unterscheiden sich also weder in der Pollenschlauchkonkurrenz zwischen durch $+^{fr}$ bzw. *fr* markierten Pollenschläuchen noch in der Konkurrenz um die Bildung des Embryosacks zwischen Gonen mit den beiden Allelen. Dies heißt aber, daß die Konkurrenz zwischen den genetisch verschiedenen Gonen in beiden Geschlechtern und in allen diesen Komplexkombinationen im gleichen Ausmaß stattfindet. Somit ist weder den unterschiedlichen Entwicklungsbedingungen, unter denen Pollenschläuche und Makrosporen stehen, noch den Unterschieden im genetischen Hintergrund, die zwischen den hier geprüften Bastarden vorhanden sind, ein Einfluß auf die Konkurrenz zuzuschreiben. Einige dieser Kombinationen, *velans·stringens* und *^{h}Hookeri·stringens*, wurden früher bereits untersucht (Harte 1948, 1953). Die damaligen Befunde ordnen sich völlig homogen in die hier gegebenen Zahlen ein, so daß die zuerst vermutete Differenz zwischen *velans*- und *^{h}Hookeri*-Kombinationen als zufällig erwiesen ist.

Wenn auch die Konkurrenz zwischen den mit *fr* und $+^{fr}$ markierten Gonen unabhängig ist von den Unterschieden, die zwischen den *Hookeri*-ähnlichen Komplexen bestehen, fragt es sich aber doch, ob sie nicht beeinflußt werden kann durch andere Faktoren, die für sich ebenfalls eine Gonenkonkurrenz zeigen. Hierfür bietet sich der Locus *s* an, der mit *fr* gekoppelt ist (Harte 1948). Als nächstes sollen daher die Ergebnisse von *^{h}Hookeri·stringens* und *^{h}Hookeri s·stringens* miteinander verglichen werden.

Die F_1 dieser beiden Kreuzungen unterscheiden sich dadurch, daß die erstere homozygot für $+^s/+^s$ ist, während die zweite für diesen Locus heterozygot ist. Die Bastarde *Oe. Hookeri* gelb × *strigosa* und *Oe. Hookeri sulfurea* × *strigosa*

Tabelle 1. *Spaltung des Faktors fr in Rückkreuzungen von Bastarden zwischen ^{h}Hookeri-ähnlichen Komplexen und Oenothera strigosa*

Kreuzung	Komplexkonstitution	Konfiguration	Lokalisation von fr in	Spaltung in Rückkreuzungen					
				fr fr ♀ × F_1 ♂			F_1 ♀ × strigosa ♂		
				fertil	pollensteril	Σ	fertil	pollensteril	Σ
Oe. (Lamarckiana × strigosa)	*velans + fr · stringens fr*	R6, R4, 2B	R4	636	68	704	233	15	248
Oe. (Hall × strigosa)	*^{h}Hall + fr · stringens fr*	2R4, 3B	R4	333	35	368	36	2	38
Oe. (hirtissima × strigosa)	*^{h}hirtissima + fr · stringens fr*	2R4, 3B	R4	40	15	55	—	—	—
Oe. (franciscana DE VRIES *× strigosa)*	*^{h}franciscana + fr · stringens fr*	2R4, 3B	R4	—	—	—	100	2	102
Oe. (Hookeri DE VRIES *· strigosa)*	*^{h}Hookeri + fr · stringens fr*	2R4, 3B	R4	273	33	306	71	3	74
				1282	151	1433	440	22	462

χ^2-Zerlegung zur Prüfung der Homogenität

	χ^2	n	P
Total	11,700	7	0,2—0,1
Zwischen Summe der Pollen- und Summe der Eizellennachkommenschaften	4,660	1	0,05—0,02
In Gruppen	7,040	6	0,5—0,3
Zwischen 4 Pollennachkommenschaften	6,540	3	0,1—0,05
Zwischen 4 Eizellennachkommenschaften	0,500	3	$> 0,9$

wurden rückgekreuzt mit *stringens* zur Prüfung der Eizellen und auf pollensterile Pflanzen zur Prüfung des Pollens. Früher waren Spaltungszahlen aus der Kombination *^{h}Hookeri · stringens* dahingehend gedeutet worden, daß eine Wechselwirkung zwischen *fr* und *s* festzustellen sei. Da aber das damals vorliegende Rückkreuzungsmaterial sehr gering war, erschien eine Erweiterung angebracht. Die neuen Daten sind zusammen mit einigen früheren in Tabelle 2 gegeben. Der Test auf Homogenität zwischen den acht Gruppen (χ^2-Zerlegung) zeigt, daß alle Differenzen im Spaltungsverhältnis fertil:steril als zufällig angesehen werden müssen. Die Berechnung der Varianzen aus dem χ^2 ergibt darüber hinaus, daß die Wirkung aller geprüften Variationsursachen, nämlich zwischen *^{h}Hookeri s* und *^{h}Hookeri +^{s}*, zwischen Pollen und Eizellen und zwischen Wiederholungen derselben Gruppe mit neu hergestellten Bastarden gleich groß ist.

Danach wurden nochmals alle Kombinationen mit *^{h}Hookeri*-ähnlichen Komplexen der genetischen Konstitution *$+^s+^{fr}/+^s fr$* zusammengefaßt und der Kombination *^{h}Hookeri s $+^{fr}$/stringens $+^s fr$* gegenübergestellt. Auch hier ergab sich völlige Homogenität (Tabelle 3). Aus diesem jetzt zahlenmäßig sowohl in der Anzahl der Individuen wie der untersuchten Gruppen ausreichenden Material ergibt sich, daß die An-

Tabelle 2. *Spaltung des Faktors fr in Rückkreuzungen von Bastarden zwischen Oenothera Hookeri bzw. Oe. Hookeri sulfurea und Oe. strigosa*

Konstitution der F_1	Rückkreuzung	geprüft	fertil	pollensteril	Σ	fertil	pollensteril	Σ
^{h}*Hookeri* $+^s+^{fr}$ · *stringens* $+^s fr$	$F_1 \times$ *strigosa*	Eizellen	71	3	74	108	14	122
	$F_1 \times$ *strigosa**	Eizellen	37	11	48			
	fr fr $\times F_1$	Pollen	273	33	306	327	36	363
	fr fr $\times F_1$*	Pollen	54	3	57			
^{h}*Hookeri* $s+^{fr}$ · *stringens* $+^s fr$	$F_1 \times$ *strigosa*	Eizellen	99	9	108	135	14	149
	$F_1 \times$ *strigosa**	Eizellen	36	5	41			
	fr fr $\times F_1$	Pollen	105	20	125	140	37	177
	fr fr $\times F_1$*	Pollen	35	17	52			

χ^2-Zerlegung

Prüfung der Homogenität	χ^2	n	P	V	P für V_x/V_{Rest}
Total	15,592	7	0,05—0,02		
Zwischen verschiedenen Gruppen	6,593	3	0,1—0,05	2,19	$>0,2$
Zwischen gleichartigen Gruppen (Rest)	8,999	4	0,1—0,05	1,12	
Zwischen Eizellen und Pollen	0,733	1	0,5—0,3	0,73	$>0,2$
Zwischen den Kombinationen mit s und $+^s$	2,229	1	0,2—0,1	2,22	$>0,2$

* Werte aus Harte 1948 übernommen.

wesenheit von s oder $+^s$ unwesentlich ist, wenn die Kombination zugleich für $fr/+^{fr}$ heterozygot ist.

Eine Bestätigung gibt die Prüfung der Spaltung für den Faktor s in Rückkreuzungen des Bastards *Oe. Hookeri sulfurea* × *strigosa*. Wie Tabelle 4 ausweist, ist die Spaltung nach der Blütenfarbe (gelb:*sulfurea*) in Nachkommenschaften von Pollen und Eizellen gleich. Sie ist bei den letzteren auch unabhängig von der Konstitution des zur Prüfung verwendeten Pollens, ^{h}*Hookeri s* aus *Oe. Hookeri sulfurea* oder *flavens s* aus *Oe. suaveolens sulfurea*. Während von verschiedenen Autoren wiederholt festgestellt werden konnte, daß in anderen Bastarden *s (sulfurea)* eine deutliche Unterlegenheit gegenüber $+^s$ (gelb) zeigt, sind hier die *sulfurea*-Pflanzen in der Überzahl. Die Unterlegenheit von $+^s$ ist nicht so groß wie die von *fr*.

Tabelle 3. *Zusammenfassung aus Tabelle 1 und 2. Spaltung des Faktors fr in Bastarden zwischen ^{h}Hookeri und ähnlichen Komplexen der genetischen Konstitution $+^s+^{fr}$ bzw. ^{h}Hookeri sulfurea ($s+^{fr}$) und stringens $+^s fr$*

Konstitution der F_1	Spaltung in Rückkreuzungen		
	fertil	pollensteril	Σ
$+^s+^{fr}/+^s fr$	1813	187	2000
$s+^{fr}/+^s fr$	275	51	326
Σ	2088	238	

Homogenitätstest: $\chi^2 = 4{,}442$; $n = 1$; $0{,}05 > P > 0{,}02$.

Für einige der Rückkreuzungen wurden Konfigurationsbestimmungen durchgeführt, die Aufschluß über das Auftreten der Restkomplexe in den Gonen geben. Dabei wird der Translokationspunkt als Testlocus für die Konkurrenz verwendet. Bei zwei Viereringen in der F_1 von ^{h}*Hookeri* · *stringens* sind vier Kombinationen in den Gonen möglich, nämlich neben den beiden reinen Elterntypen auch die durch freie Rekombination zwischen den Chromosomen der beiden Ringe entstandenen Mischformen. Die Chromosomenformeln hierfür sind zusammen mit den Ergebnissen in Tabelle 5 aufgeführt. Da für einige Pflanzen eine Konfigurationsbestimmung wegen Mangel an Pollenmutterzellen im geeigneten Stadium nicht durchgeführt werden konnte, sind die Summen für die klassifizierten Pflanzen in den einzelnen Rückkreuzungen geringer als in den anderen Tabellen, obwohl es sich um dieselben Aufzuchten handelt.

Die letzte Spalte der Tabelle 5 zeigt als erstes, daß die Kombination der *stringens*-Chromosomen beider Vierringe sehr selten auftritt, während die Kombination beider *Hookeri*-Anteile sehr häufig ist (1. Spalte). Aus dem Vergleich der beiden Mischtypen, die in der Rückkreuzung mit *flavens* unterschieden werden können, ergibt sich, daß die Benachteiligung

Tabelle 4. *Spaltung des Faktors s in Rückkreuzungen des Bastards Oe. Hookeri sulfurea × strigosa*

Rückkreuzung	Geprüft	Spaltung		Σ
		gelb	*sulfurea*	
$F_1 \times$ *Oe. suaveolens sulfurea*	Eizellen	21	58	79
$F_1 \times$ *Oe. Hookeri sulfurea*	Eizellen	68	166	234
Oe. Hookeri sulfurea $\times F_1$	Pollen	4	24	28

χ^2-Zerlegung

Prüfung der Homogenität	χ^2	n	P
Total	2,202	2	0,2—0,1
Zwischen Pollen und Eizellen	2,058	1	0,2—0,1
Zwischen verschiedenen Rückkreuzungen der Eizellen	0,144	1	0,8—0,7

des zweiten Ringes dabei am stärksten ist. Die Seltenheit der Rekombinanten, bei denen die *Hookeri*-Chromosomen des ersten Ringes mit den *stringens*-Allelen $+^s$ bzw. *fr* vereinigt sind, bestätigt die enge Koppelung dieser Loci mit dem Translokationspunkt.

II. flavens·stringens

Die Kombination *flavens·stringens* liegt in drei Verbindungen vor. Die Prüfung der genetischen Konstitution der Eizellen erfolgte durch Rückkreuzung mit *Oe. strigosa* und *Oe. Hookeri*. Die Herkunft der F_1 und die Ergebnisse der Rückkreuzungen sind aus Tabelle 6 zu ersehen.

Die Spaltung für den Faktor *fr* (Pollensterilität) in der Rückkreuzung der Eizellen mit *Oe. strigosa* ist in allen drei Fällen 1:1 und homogen. Die Chromosomenkonfiguration entspricht in allen untersuchten Pflanzen der F_1 (R4, 5B). Pflanzen mit sieben Bivalenten, die aus Eizellen mit dem *stringens*-Anteil des Viereringes (Chromosomen 5·14, 6·13) hervorgehen könnten, treten nicht auf. Da außerdem die Häufigkeit der tauben Samen sehr gering ist, ist zu vermuten, daß der *stringens*-Anteil des Viereringes nicht in der Eizelle vorkommt und durch den *flavens*-Anteil verdrängt wird. Als Testkomplex zur Prüfung dieser Frage wurde ^{h}*Hookeri* verwendet. Diese Kreuzungen ergeben überwiegend Pflanzen mit einem Viererring, die also der Kombination *flavens·*^{h}*Hookeri* entsprechen, und in jeder der beiden Rückkreuzungen je zwei Pflanzen mit zwei Viererringen, die aus Eizellen mit dem Restkomplex *stringens* entstanden sein müssen. In der Kombination *flavens·stringens* liegt also in der Eizelle eine sehr starke Konkurrenz zwischen dem Restkomplex *flavens* (Chromosomen 5·6, 13·14) und dem Restkomplex *stringens* (5·14, 13·6) vor. Das Fehlen der *stringens*-Homozygoten in den Rückkreuzungen, die an sich aus den wenigen *stringens*-Eizellen entstehen konnten, kann durch die Anwesenheit eines zygotischen Letalfaktors im *stringens*-Restkomplex erklärt werden.

Die Prüfung des Pollens erfolgte durch Kreuzungen auf *Oe. Hookeri*, um die Wirkung von Letalfaktoren auszuschalten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt. Aus ihr geht hervor, daß die Pflanzen mit einem und zwei Viererringen etwa gleich häufig sind. Zwischen Pollenkörnern mit den beiden Restkomplexen findet demnach keine meßbare Konkurrenz statt. Nebenbei sei bemerkt, daß auch in der Nachkommenschaft des metaklinen Bastards *stringens·flavens* pollensterile Pflanzen auftraten. Die früher geäußerte Vermutung, daß das Auftreten des Komplexes stringens in Eizellen von *Oe. strigosa* an den Austausch des *fr*-tragenden Chromosomenabschnittes gebunden sei, trifft demnach nicht zu (OEHLKERS u. HARTE 1943).

III. (flavens·^{h}*Hookeri)·stringens*

Bei der nächsten Versuchsgruppe wurde von folgender Überlegung ausgegangen: Zwischen den Komplexkombinationen *flavens·stringens* und ^{h}*Hookeri·stringens* wird ein Unterschied in der Konkurrenz gefunden, wenn *fr* als Testlocus verwendet wird. Da der Komplex *stringens* beiden Kombinationen gemeinsam ist, muß zwischen den Komplexen *flavens* und ^{h}*Hookeri* ein Unterschied bestehen, der

Tabelle 5. *Häufigkeit der Pflanzen mit unterschiedlichen Konfigurationen in Rückkreuzungen der F_1 ^{h}Hookeri s·stringens mit verschiedenen Testkomplexen* (a = Konstitution der Eizelle; b = Konfiguration der daraus entstandenen Pflanze).

Rückkreuzung	Chromosomenformel des Testkomplexes	Phänotyp	a	b	a	b	a	b	a	b
			^{h}*Hookeri*		Mischtyp 1		Mischtyp 2		*stringens*	
			1·2, 3·4 5·6, 13·14		1·2, 3·4 5·14, 13·6		1·4, 2·3 5·6, 13·14		1·4, 2·3 5·14, 13·6	
F_1 × *suaveolens sulfurea*	1·4, 2·3 5·6, 13·14	gelb *sulf.*	1 34	R4, 5B	1 2	2R4, 3B	10 —	7B	*	R4, 5B
Oe. Hookeri sulfurea × F_1	1·2, 3·4 5·6, 13·14	gelb *sulf.*	— 14	7B	1 8			R4, 5B	3 —	2R4, 3B
F_1 × *Hookeri sulfurea*	1·2, 3·4 5·6, 13·14	gelb *sulf.*	1 85	7B	33 6			R4, 5B	2 —	2R4, 3B
F_1 × *strigosa*	1·4, 2·3 5·14, 13·6	fertil steril	48 —	2R4, 3B	1 6			R4, 5B	— —	7B
Oe. (Hookeri DE VRIES × *strigosa)* × *strigosa*	1·4, 2·3 5·14, 13·6	fertil steril	19 1	2R4, 3B	— 1			R4, 5B	— —	7B

* Der Konfiguration nach nicht von Pflanzen aus Hookeri-Eizellen zu unterscheiden.

Tabelle 6. *Prüfung der Eizellen der F_1 flavens·stringens durch Untersuchung der Spaltung in der Nachkommenschaft*

F_1 ♀	Prüfung mit	Eizelle enthielt				$_{-}fr$ (fertil)	*fr* (pollensteril)
		Restkomplex *flavens*		Restkomplex *stringens*			
		Anzahl	Konfiguration	Anzahl	Konfiguration		
Oe. (suaveolens gelb × *strigosa) flavens*$+^s+^{fr}$ · *stringens*$+^sfr$ . .	× *strigosa* ♂	32	(R4, 5B)	0	(7B)	24	19
Oe. (suaveolens gelb × *strigosa) flavens*$+^s+^{fr}$ · *stringens*$+^sfr$ . .	× *Hookeri* ♂	50	(R4, 5B)	2	(2R4, 3B)	—	—
Oe. (suaveolens sulfurea × *strigosa) flavens* $s+^{fr}$ · *stringens*$+^sfr$ . .	× *strigosa* ♂	60	(R4, 5B)	0	(7B)	52	50
Oe. (suaveolens sulfurea × *strigosa) flavens* $s+^{fr}$ · *stringens*$+^sfr$ . .	× *Hookeri* ♂	20	(R4, 5B)	2	(2R4, 3B)	—	—
Oe. (strigosa × *suaveolens sulfurea) stringens*$+^sfr$ · *flavens* $s+^{fr}$ (Metakliner Bastard)	× *strigosa* ♂	36	(R4, 5B)	0	(7B)	22	29
	Selbstung	13	(R4, 5B)			—	-

Tabelle 7. *Prüfung des Pollens der F_1 flavens·stringens durch Untersuchung der Spaltung in der Nachkommenschaft*

Prüfung mit F_1 ♂	Pollen enthielt Restkomplex	
	flavens	*stringens*
	Konfiguration	
	(R 4, 5 B)	(2 R 4, 3 B)
1. *Oe.* [(*Hookeri* ♀ × *suaveolens gelb*) × *strigosa*] *flavens* + *s* + *fr* · *stringens* + *s fr*	37	43*
2. *Oe.* [(*Hookeri* ♀ × *suaveolens sulfurea*) × *strigosa*] *flavens s* + *fr* · *stringens* + *s fr*	32	57*

* jeweils Summe aus zwei Kreuzungen.

Homogenitätstest für alle vier Aufzuchten

Variationsursache	χ^2	n	P
Total	12,97	4	—
1:1-Spaltung	5,67	1	0,02—0,01
Homogenität zwischen den vier Aufzuchten	7,28	3	0,1—0,05
Homogenität zwischen den Gruppen 1 und 2	1,79	1	0,2—0,1
Homogenität innerhalb der Gruppen	5,49	2	0,1—0,05

die Ursache für dieses verschiedenartige Ergebnis ist. Die einfachste Annahme ist diese, daß ein Genlocus vorhanden ist, der die Konkurrenz beeinflußt, und daß die genannten Komplexe in den Allelen dieses Locus differieren, *flavens* und *stringens* dagegen Allele enthalten, die sich in ihrer Wirkung auf die Entwicklung von Pollenschlauch und Embryosack nicht unterscheiden. Es bleibt dabei zunächst offen, ob dieser Locus mit *fr* identisch oder mit ihm gekoppelt ist. Dann muß aber auch ein crossing-over zwischen diesem Locus und dem Restkomplex möglich sein, und es sind Keimzellen zu erwarten, die einen Restkomplex zusammen mit dem Konkurrenzallel des anderen Komplexes enthalten. Nach Kreuzung von *flavens*·^{h}*Hookeri* mit *stringens* entsteht eine Population von Pflanzen, die in bezug auf die Komplexkonstitution *flavens*·*stringens* oder ^{h}*Hookeri*·*stringens* sind, aber in verschiedener Kombination mit den beiden Konkurrenzallelen. Dies muß sich dann in der Nachkommenschaft in einer Verschiebung der Spaltungsverhältnisse von *fr* zeigen, wenn zum Vergleich die in den Abschnitten I und II beschriebenen Kreuzungen herangezogen werden.

Als ♀ Kreuzungselter wurden verschiedene Kombinationen von *flavens*·^{h}*Hookeri* mit den Allelen *s* und $+^s$ gewählt, die aus Tabelle 8 ersichtlich sind. Diese wurden mit *stringens* ♂ gekreuzt. Von einer Anzahl von Pflanzen dieser F_1 wurde die Konfiguration bestimmt und einige mit zwei Viererringen entsprechend der Komplexkonstitution ^{h}*Hookeri*·*stringens* für die Weiterzucht ausgesucht. Diese sind also alle in den Ringchromosomen mit den Enden 1 bis 4 für den *fr*-Locus und den Translokationspunkt heterozygot. Dabei ist das Allel *fr* mit den Konkurrenzeigenschaften des *stringens*-Komplexes verbunden oder gekoppelt, und der Restkomplex ^{h}*Hookeri* bringt entweder das eigene Konkurrenzallel oder durch crossing-over dasjenige von *flavens* mit. Diese F_1-Pflanzen wurden als ♀ und ♂ Kreuzungspartner verwendet (Rückkreuzung mit *Oe. strigosa* bzw. auf pollensterile Pflanzen), um sowohl die Pollenschlauchkonkurrenz wie die Gonenkonkurrenz im Embryosack untersuchen zu können.

Tabelle 8a. *Spaltung nach pollenfertil:pollensteril in Rückkreuzungen der F_1 (flavens·^{h}Hookeri)·stringens*

	F_1*	Anzahl der F_1-Pflanzen	Homogenitätstest		Spaltung in der Gruppe der homogenen Nachkommenschaften						Spaltung in den abweichenden Nachkommenschaften			
									Homogenitätstest					
			χ^2	P	n	fertil	steril	Σ	χ^2	P	n	fertil	steril	Σ
	I. Prüfung der Eizellen durch Rückkreuzung der F_1♀ mit *Oe. strigosa* ♂													
a	(sg × Hg) × str	6	20,69	< 0,001	5	176	45	221	0,93	0,9	1	16	23	39
b	(Hg × sg) × str	8	—	—	8	69	26	95	9,49	0,3—0,2	—	—	—	—
c	(ss × Hs) × str	13	19,62	0,1—0,05	12	267	92	359	11,51	0,5—0,3	1	13	15	28
d	(ss × Hg) × str	8	47,28	< 0,001	6	183	49	232	6,06	0,5—0,3	2	21	42	63
e	(sg × Hs) × str	6	—	—	6	149	17	166	9,03	0,2—0,1	—	—	—	—
	Σ				37	844	229	1073						
	II. Prüfung der Pollenschläuche durch Rückkreuzung der F_1 ♂ auf pollensterile Pflanzen *fr/fr* ♀													
a	(sg × Hg) × str	2	—	—	2	71	53	124	1,12	0,3—0,2	—	—	—	—
b	(Hg × sg) × str	2	—	—	2	82	69	151	1,11	0,3—0,2	—	—	—	—
c	(ss × Hs) × str	2	—	—	2	61	68	129	0,31	0,7—0,5	—	—	—	—
d	(ss × Hg) × str	3	—	—	3	103	16	119	1,70	0,5—0,3	—	—	—	—
	Σ				9	317	206	523						

* Abkürzungen: sg = *Oe. suaveolens* gelb, *flavens* $+^{s}+^{fr}$; ss = *Oe. suaveolens sulfurea, flavens* $s+^{fr}$; Hg = *Oe. Hookeri* DE VRIES, gelbblütig, ^{h}*Hookeri* $+^{s}+^{fr}$; Hs = *Oe. Hookeri sulfurea,* ^{h}*Hookeri* $s+^{fr}$; str = *Oe. strigosa, stringens* $+^{s}$*fr.*

Tabelle 8b. χ^2-*Analyse für die Daten der Tabelle 8a*

Variationsursache	χ^2	n	P	V	F	P
I. Prüfung der Eizellen						
a) „Normale" Nachkommenschaften						
Total	401,80	37	-			
Spaltung 1:1	352,49	1	$<0{,}001$			
Homogenität total	49,30	36	$\sim 0{,}02$			
Homogenität zwischen F_1	12,29	4	0,02—0,01	3,07	2,64	$>0{,}05$
Homogenität zwischen den Nachkommenschaften verschiedener Pflanzen derselben F_1	37,02	32	0,2	1,16		
b) Nachkommenschaften der Ausnahmepflanzen						
Total	8,51	4	—			
Spaltung 1:1	6,92	1	0,01—0,001			
Homogenität	1,59	3	0,3—0,2			
II. Prüfung der Pollenschläuche						
a) Alle F_1						
Total	71,95	9	—			
Spaltung 1:1	23,56	1	$<0{,}001$			
Homogenität total	48,39	8	$<0{,}001$			
Homogenität zwischen F_1	44,16	3	$<0{,}001$			
Homogenität zwischen den Nachkommenschaften verschiedener Pflanzen derselben F_1	4,24	5	0,7—0,5			
b) F_1 Nr. 1—3						
Total	6,65	6	—			
Spaltung 1:1	1,43	1	0,3—0,2			
Homogenität total	5,22	5	0,5—0,3			
Homogenität zwischen F_1	2,69	2	0,3—0,2			
Homogenität zwischen den Nachkommenschaften verschiedener Pflanzen derselben F_1	2,53	3	0,5—0,3			

In der Nachkommenschaft wurde die Spaltung nach pollenfertil:steril ausgezählt und bei einer größeren Anzahl von Pflanzen die Konfiguration bestimmt. Wenn die Hypothese eines möglichen crossing-over des Konkurrenzgens zwischen den Komplexen *flavens* und *hHookeri* zutrifft, dann müssen neben Nachkommenschaften, die eine Spaltung mit Überwiegen von *+fr* gegenüber *fr* zeigen, entsprechend den im ersten Abschnitt dargestellten Kreuzungen mit *hHookeri*-ähnlichen Komplexen auch solche auftreten, bei denen die Spaltung angenähert 1:1 ist, wie bei der Nachkommenschaft von *flavens·stringens*. Die Prüfung der Eizellen ergibt im allgemeinen ein starkes Überwiegen der pollenfertilen Pflanzen, also die bekannte Benachteiligung von *stringens fr* gegenüber *hHookeri +fr*. Unter insgesamt 37 Nachkommenschaften traten jedoch in drei Gruppen vier Pflanzen auf, die eine deutlich abweichende Spaltung erkennen ließen, indem die pollensterilen Pflanzen häufiger sind als die fertilen. Der χ^2-Test zeigt, daß diese drei Gruppen von F_1-Nachkommenschaften in sich inhomogen sind, die Differenzen also nicht zufälliger Art sein können, während bei Ausschaltung der einen bzw. zwei abweichenden Nachkommenschaften die Homogenität der übrigen gut ist (Tabelle 8a und b, I). Auch die Zusammenfassung der fünf Gruppen von Nachkommenschaften aus verschiedenen F_1 zeigt die gute Übereinstimmung sowohl zwischen wie in den Gruppen, wenn die vier Abweicher ausgeschlossen werden. Der Varianzvergleich ergibt darüberhinaus, daß die Variabilität zwischen und in den Gruppen im Rahmen der Fehlerbreite gleich groß ist (Tabelle 8b, Ia). Auch die Nachkommenschaften der Ausnahmepflanzen sind unter sich homogen, unabhängig von der F_1-Gruppe, aus der sie hervorgegangen sind. Die Abweichung von der Erwartung 1:1 durch das Überwiegen der pollensterilen Pflanzen ist gesichert.

Tabelle 9a. *Spaltung nach der Konfiguration in der Rückkreuzung der F_1 Oe. (flavens·^{h}Hookeri) × strigosa mit Oe. strigosa*

F_1			Konfiguration			Σ	Spaltungsgruppe
Kreuzung	Pfl. Nr.	genetische Konstitution	7 B	R 4, 5 B	2 R 4, 3 B		
(fl $+^s$· ^{h}H $+^s$) × str*	1	$+^s+^{fr}/+^s$fr	—	1	27	28	1
	4	$+^s+^{fr}/+^s$fr	—	3	25	28	1
	5	$+^s+^{fr}/+^s$fr	—	6	29	35	1
	8	$+^s+^{fr}/+^s$fr	—	1	13	14	1
	9	$+^s+^{fr}/+^s$fr	—	5	1	6	2
(fl s · ^{h}Hs) × str . . .	3	s $+^{fr}/+^s$fr	—	14	—	14	2
	5	s $+^{fr}/+^s$fr	1	4	18	23	1
	6	s $+^{fr}/+^s$fr	—	11	5	16	2
	7	s $+^{fr}/+^s$fr	—	15	4	19	2
	8	s $+^{fr}/+^s$fr	—	5	—	5	2
	9	s $+^{fr}/+^s$fr	—	29	2	31	2
(fl s · ^{h}H $+^s$) × str . .	1	$+^s+^{fr}/+^s$fr	—	7	7	14	2
	2	$-+^{fr}/+_s$fr	—	18	4	22	2
	3	$-+^{fr}/+^s$fr	—	11	22	33	1
	5	$+^s+^{fr}/+^s$fr	—	6	26	32	1
	6	$-+^{fr}/+^s$fr	—	2	21	23	1
(fl $+^s$.^{h}Hs) × str . .	1	$-+^{fr}/+^s$fr	—	3	5	8	3
	3	$-+^{fr}/+^s$fr	—	—	6	6	1
	4	$-+^{fr}/+^s$fr	—	3	24	27	1
	5	$-+^{fr}/+^s$fr	—	5	25	30	1
	7	$-+^{fr}/+^s$fr	—	1	6	7	1
Σ Gruppe 1			1	43	242	286	
Σ Gruppe 2			—	104	23	127	
Σ Gruppe 1+2 . . .			1	147	265	413	

Spaltungsgruppe 1 = Überwiegen von Pflanzen mit 2 Viererringen,
Spaltungsgruppe 2 = Überwiegen von Pflanzen mit 1 Viererring,
Spaltungsgruppe 3 = eindeutige Zuordnung zu 1 oder 2 nicht möglich.

* Abkürzungen s. Tabelle 8.

Tabelle 9b. *χ^2-Analyse der Daten aus Tabelle 9a*

Variationsursache	χ^2	n	P
a) Gesamtanalyse			
Total	103,99	20	—
Spaltung 1:1	16,57	1	$<0{,}001$
Homogenität total . .	87,42	19	$<0{,}001$
Homogenität zwischen Gruppe 1 und 2 . . .	77,79	1	$<0{,}001$
Homogenität in Gruppen	9,63	18	$>0{,}9$

Variationsursache	χ^2	n	P
b) Einzelanalyse für die Nachkommenschaften der Gruppe 1			
Total	72,64	12	—
Spaltung 1:1 . .	68,54	1	$\ll 0{,}001$
Homogenität . .	4,10	11	$>0{,}9$
Einzelanalyse für die Nachkommenschaften der Gruppe 2			
Total	31,35	8	—
Spaltung 1:1 . .	25,83	1	$<0{,}001$
Homogenität . .	5,52	7	0,7—0,5

Die Prüfung der Pollennachkommenschaften ergibt das gleiche Bild. In drei Fällen liegt das erwartete Defizit an pollensterilen Pflanzen vor, während drei weitere Nachkommenschaften eine angenäherte 1:1-Spaltung zeigen. Beide Gruppen sind in sich homogen.

In den F_1-Gruppen a und b aus Tabelle 8 und 9 sind alle Pflanzen sicher homozygot $+^s/+^s$, in c heterozygot $s/+^s$. In den Gruppen d und e wurden einige Pflanzen durch Rückkreuzung mit *Oe. suaveolens sulfurea* daraufhin geprüft, ob sie für s heterozygot seien. Es fanden sich sowohl homozygote $+^s/+^s$ wie heterozygote $s/+^s$ Pflanzen. Für die Konkurrenz,

Tabelle 10. *Spaltung in den Nachkommenschaften der F_1 verschiedener Kombinationen mit verschiedenen*

Zeilen-Nummer		Spalten-1 F_1	2 Formel	3 Rückkreuzung*	4 Testkomplex
1	a	*Oe. (suaveolens* gelb × *Hookeri* DE VRIES*)*	fl+ · H+	× *Oe. Hookeri sulfurea* ♂	^{h}*Hookeri s de*
	b			× *Oe. suaveolens sulfurea* ♂	*flavens s* + ^{de}
	c			× *Oe. strigosa* ♂	*stringens* + ^{s} *de*
2	a	*Oe. (suaveolens* gelb × *Hookeri sulfurea)*	fl + · Hs	× *Oe. Hookeri sulfurea* ♂	^{h}*Hookeri s de*
	b			× *Oe. suaveolens sulfurea* ♂	*flavens s*+ ^{de}
3	a	*Oe. (suaveolens sulfurea* × *Hookeri* DE VRIES*)*	fl s · H+	× *Oe. Hookeri* DE VRIES ♂	^{h}*Hookeri* + ^{s}
	b			× *Oe. Hookeri* DE VRIES ♂	^{h}*Hookeri* + ^{s}*de*
	c			× *Oe. suaveolens sulfurea* ♂	*flavens s* + ^{de}
	d			× *Oe. suaveolens sulfurea* ♂	*flavens s* + ^{de}
	e			× *Oe. strigosa* ♂	*stringens* + ^{s}*de*
4	a	*Oe. (suaveolens sulfurea* × *Hookeri sulfurea)*	fl s · Hs	× *Oe. Hookeri sulfurea* ♂	^{h}*Hookeri s de*
	b			× *Oe. suaveolens* gelb ♂	*flavens* + ^{s} + ^{de}
	c			× *Oe. suaveolens sulfurea* ♂	*flavens s* + ^{de}
	d			× *Oe. strigosa* ♂	*stringens* + ^{s}*de*
5	a	*Oe. (Hookeri* DE VRIES × *suaveolens* gelb*)*	H+ · fl+	× *Oe. Hookeri sulfurea* ♂	^{h}*Hookeri s de*
	b			× *Oe. suaveolens sulfurea* ♂	*flavens s* + ^{de}
6		*Oe. (Hookeri sulfurea* × *suaveolens* gelb*)*	Hs · fl+	× *Oe. suaveolens sulfurea* ♂	*flavens s* + ^{de}
7	a	*Oe. (Hookeri* DE VRIES × *suaveolens sulfurea)*	H+ · fl s	× *Oe. Hookeri sulfurea* ♂	^{h}*Hookeri s de*
	b			× *Oe. suaveolens sulfurea* ♂	*flavens s* + ^{de}
8		*Oe. (Hookeri sulfurea* × *suaveolens sulfurea)*	Hs · fl s	× *strigosa* ♂	*stringens* + ^{s}*de*
9		*Oe. (suaveolens* gelb × *Hookeri sulfurea)*	fl+ · Hs	*Oe. Hookeri sulfurea* ♀ × F_1	^{h}*Hookeri s*
10		*Oe. (suaveolens sulfurea* × *Hookeri* DE VRIES*)*	fl s · H+	*Oe. Hookeri sulfurea* ♀ × F_1	^{h}*Hookeri s*

* Nachkommen aus einer Rückkreuzung, die in zwei Jahren getrennt aufgezogen wurden. Wiederholungen der Rückkreuzung, die in verschiedenen Jahren hergestellt wurden.

gemessen am Verhalten von *s* als Testlocus, ergeben sich keine neuen Gesichtspunkte gegenüber den in den anderen Abschnitten behandelten Kombinationen. Die Ergebnisse dieser nicht sehr umfangreichen Rückkreuzungen wurden daher hier nicht im einzelnen aufgeführt, sondern nur in Tabelle 9a, Spalte 3 (genetische Konstitution der F_1) berücksichtigt. Es ließ sich kein Einfluß von *s* bzw. $+^{s}$ auf die Spaltung von fr:$+^{fr}$ feststellen. Die Verteilung der *s*-Allele in der ♀ P-Generation der F_1 hat keinen Einfluß auf die Gonenkonkurrenz.

Für vier Gruppen von Rückkreuzungsnachkommenschaften liegen Konfigurationsbestimmungen vor (Tabelle 9a und b). Da die aus der F_1 [*(flavens*·^{h}*Hookeri)* × *stringens*] ausgewählten Pflanzen alle zwei Viererringe besaßen, also in bezug auf die Anordnung der

der Komplexe flavens und ^{h}Hookeri mit den Allelen s und $+^{s}$ aus Rückkreuzungen Testkomplexen

Nummer									
5				6		7			
Spaltung									
Blütenfarbe				Gipfelform		Restkomplex			
aus *flavens*		aus ^{h}*Hookeri*		spitz $+^{de}$ aus *flavens*	breit *de* aus ^{h}*Hookeri*	*flavens*		^{h}*Hookeri*	
Anzahl	Allel	Anzahl	Allel			Anzahl	Konfiguration	Anzahl	Konfiguration
—	—	—	—	54	62	38	R4, 5B	36	7B
-	-	—	-	—	—	57	7B	60	R4, 5B
—	—	—	—	—	—	2	R4, 5B	6	2R4, 3B
139	$+^{s}$	146	s	25	89	64	R4, 5B	56	7B
156	$+^{s}$	147	s	—	—	40	7B	87	R4, 5B
–	—	—	—	—	—	17	R4, 5B	14	7B
—	—	—	—	35	93	45	R4, 5B	72	7B
26	s	38	$+^{s}$	—	—	13	7B	31	R4, 5B
77	s	70	$+^{s}$	—	—	53	7B	59	R4, 5B
–	—	—	—	—	—	2	R4, 5B	3	2R4, 3B
—	—	—	—	44	78	53	R4, 5B	52	7B
—	—	—	—	—	—	10	7B	22	R4, 5B
—	—	—	—	—	—	22	7B	46	R4, 5B
	—	—	—	—	—	10	R4, 5B	7	2R4, 3B
—	—	—	—	36	110	62	R4, 5B	78	7B
—	—	—	–	—	—	10	7B	32	R4, 5B
62	$+^{s}$	121	s	—	—	41	7B	99	R4, 5B
67	s	99	$+^{s}$	34	120	63	R4, 5B	76	7B
4	s	18	$+^{s}$	—	—	2	7B	13	R4, 5B
—	—	—	—	—	—	8	R4, 5B	8	2R4, 3B
21	$+^{s}$	7	s	—	—	—	—	—	—
2	s	5	$+^{s}$	—	—	—	—	—	—

sind nach Prüfung der Homogenität zusammengefaßt (Wiederholung der Aufzucht). sind getrennt aufgeführt.

Chromosomenenden der Komplexkombination ^{h}*Hookeri·stringens* entsprachen, wurden nach Rückkreuzung dieser F_1 mit *Oe. strigosa* drei verschiedene Konfigurationen erwartet: sieben Bivalente, wenn der *stringens*-Anteil beider Viererringe in der Eizelle enthalten war, ein Viererring und fünf Bivalente, entsprechend dem *stringens*-Anteil eines Viererringes und dem *Hookeri*-Anteil des anderen, und schließlich Pflanzen mit zwei Viererringen, die in der Eizelle den ^{h}*Hookeri*-Anteil beider Viererringe der F_1 übernommen hatten. Unter den 415 Pflanzen, von denen die Konfiguration bestimmt wurde, trat jedoch nur eine mit sieben Bivalenten auf. Ebenso wie in den in Abschnitt I beschriebenen F_1-Kombinationen entstehen die lebensfähigen Pflanzen der Rückkreuzungsgeneration aus Eizellen mit den *Hookeri*-Chromosomen

5·6 und 13·14. Pflanzen mit einem Viererring müssen also aus Eizellen entstehen, die den *stringens*-Anteil des ersten Ringes (Chromosomen 1·4, 2·3) enthielten. Bei zwei Viererringen ist entsprechend auf die Entstehung aus einer Eizelle mit dem *Hookeri*-Anteil dieses Ringes (Chromosomen 1·2, 3·4) zu schließen. Durchweg überwiegen die Pflanzen mit zwei Viererringen. Einige Aufzuchten fallen jedoch aus dem Rahmen, indem die Pflanzen mit einem Viererring in der Mehrzahl sind. Es sind dies dieselben Aufzuchten, bei denen auch die Verschiebung der Spaltung fertil:pollensteril auf eine Änderung der Konkurrenzverhältnisse in der F_1 schließen ließ [z. B. Pflanze 2 aus [(*flavens s·Hookeri* $+^s$) × *stringens*] und mehrere Pflanzen aus [(*flavens s. Hookeri s*) × *stringens*]. Wegen der relativ geringen Anzahl von Individuen, für die in den einzelnen Kreuzungen die Konfiguration bestimmt werden konnte, kann eine Aufgliederung zur Untersuchung des crossing-over zwischen *fr* und dem Translokationspunkt nichts über das bereits Bekannte hinaus ergeben. Die entsprechenden Tabellen wurden daher hier nicht aufgenommen.

IV. flavens·^{h}Hookeri

a) Material. In Kreuzungen zwischen *Oe. suaveolens* und *Hookeri* sind die beteiligten Komplexe durch eine Translokation der Chromosomenenden 1—2 —3 —4 unterschieden. Die beiden Restkomplexe haben die Chromosomenformel ^{h}*Hookeri* 1·2, 3·4 und *flavens* 1·4, 2·3. Im Ende 3 liegt der Locus *s*. *Flavens* enthält immer das Allel $+^{de}$ (spitzer Gipfel: dominant) und ^{h}*Hookeri de* (flacher, breiter Gipfel: recessiv). Insgesamt stehen also in dieser Koppelungsgruppe drei Testloci zur Verfügung. Das Plasma der F_1 stammt aus *Oe. suaveolens* oder *Hookeri*.

Tabelle 11. *Wiederholung der Aufzucht zweier Rückkreuzungen in 2 Jahren. Prüfung des Einflusses des Testkomplexes und der Aufzuchtbedingungen der Rückkreuzungsgeneration auf die Spaltung. F_1: Oe. (suaveolens gelb × Hookeri sulfurea)*

Aufzucht der Rückkreuzung	Testkomplex	Blütenfarbe		Σ
		gelb	*sulfurea*	
1. Jahr	^{h}*Hookeri s*	59	74	133
	flavens s	81	88	169
2. Jahr	^{h}*Hookeri s*	80	72	152
	flavens s	75	59	134

Homogenitätstest

Variationsursache	χ^2	n	P
Total	4,313	4	—
Spaltung 1:1	0,007	1	>0,9
Homogenität total	4,306	3	0,3 0,2
Zwischen Aufzuchtjahren	3,609	1	0,1—0,05
Zwischen Testkomplexen	0,432	1	0,7—0,5
Rest	0,265	1	0,7—0,5

Durch Anwendung verschiedener Kombinationen zwischen den beiden Komplexen und den Allelen des *s*-Locus für die Ausgangskreuzungen entstehen acht verschiedene F_1-Kombinationen (Tabelle 10, Spalte 1—2). Diese sind alle heterozygot für *de*/$+^{de}$ und die durch die Translokationspunkte markierten Restkomplexe. Im übrigen sind vier homozygot für $+^s$ (Tabelle 10, Zeile 1 und 5) bzw. *s* (Zeile 4 und 8); die vier restlichen sind heterozygot für diesen Locus. Je zwei der acht F_1-Kombinationen sind reziprok (Zeile 1—5, 2—6, 3—7, 4—8), und es sind zwei Paare komplementärer Bastarde vorhanden (Zeile 2—3 und 5—6). Die Konstitution der Eizellen der verschiedenen F_1-Bastarde wurde mit Hilfe von Rückkreuzungen mit Testkomplexen geprüft. Die im einzelnen durchgeführten Kreuzungen und die Konstitution der Testkomplexe sind aus Tabelle 10, Spalte 3 und 4 zu ersehen. An den aus diesen Rückkreuzungen hervorgehenden Pflanzen wurden, soweit möglich, drei Merkmale bestimmt: Blütenfarbe (gelb-*sulfurea*), Gipfelform (flach-spitz) und Chromosomenkonfiguration in der Meiosis der PMZ, die Rückschlüsse auf den Restkomplex in der Eizelle zuläßt. Die Spaltungszahlen für die einzelnen Nachkommenschaften sind in den Spalten 5 bis 7 der Tabelle 10 enthalten. Die Summenwerte für die drei Spalten sind nicht immer genau gleich, weil bei der Bestimmung der Konfiguration einige Pflanzen durch Mangel an geeigneten Stadien der Meiosis ausfallen und die Gipfelform bei einigen Pflanzen nicht sicher zu bestimmen war.

b) Voruntersuchungen. An diesen Werten ist zunächst zu prüfen, ob die Spaltungszahlen, die die Grundlage für die Schlußfolgerungen bilden sollen, durch verschiedene Aufzucht-

bedingungen der Rückkreuzungsgeneration verschoben werden können. Für zwei Rückkreuzungen der F_1 (*flavens* $+^s$.^{h}*Hookeri s*) mit ^{h}*Hookeri s* und *flavens s* wurde die Samenprobe in zwei Gruppen geteilt, die in verschiedenen Jahren aufgezogen wurden. Der Homogenitätstest für die Spaltung nach gelben und *sulfurea*-Blüten zeigt völlige Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der beiden Jahre, und auch die Verwendung verschiedener Testkomplexe für die Rückkreuzungen hat keinen Einfluß auf die Spaltung (Tabelle 11). Für die weitere Auswertung wurden dementsprechend alle Werte getrennter Aufzuchten einer Rückkreuzung in verschiedenen Jahren zusammengefaßt.

Tabelle 12. *Untersuchung der F_1 Oe. (suaveolens sulfurea ♂ Hookeri* DE VRIES*) flavens s · ^{h}Hookeri $+^s$ in 2 verschiedenen Jahren. Einfluß des Testkomplexes und der Aufzuchtbedingungen der F_1 auf die Spaltung*

Variationsursache	χ^2	n	P
Homogenitätstest			
Total	14,10	4	
Spaltung 1:1	7,24	1	0,01—0,001
Homogenität total	6,86	3	0,1—0,05
Homogenität zwischen Jahren	0,21	1	0,7—0,5
Homogenität zwischen Testkomplexen	0,02	1	0,9—0,8
Restvariabilität	6,64	1	0,01

Die zweite Prüfung befaßt sich mit der Wiederholung der Aufzucht der F_1 und Durchführung der gleichen Rückkreuzung in 2 Jahren. Dies wurde für die F_1 *flavens* ^{s}.^{h}*Hookeri*$+_s$ durchgeführt und Rückkreuzungen mit ^{h}*Hookeri* $+^s$ und *flavens s* hergestellt. Es wurde vergleichend die Spaltung der Restkomplexe geprüft. Die Spaltungszahlen sind in Tabelle 10, Spalte 7, Zeilen 3a bis d enthalten, die Analyse in Tabelle 12. Die Abweichungen der Summe von der erwarteten Spaltung 1:1 ist gesichert, und zwar überwiegt der *Hookeri*-Anteil. Die Homogenität zwischen den vier Serien ist nicht besonders gut. Die Zerlegung in die einzelnen Komponenten zeigt, daß die verwendeten Testkomplexe ^{h}*Hookeri* und *flavens* keinen Einfluß auf das Ergebnis haben. Ebenso ist die Durchführung der Rückkreuzungen in verschiedenen Jahren ohne Bedeutung. Dagegen ist die Restvariabilität mit $P = 0{,}01$ genau an der Grenze der statistischen Sicherung. Es bestehen also erhebliche Abweichungen zwischen Wiederholungen, ohne daß hierfür eine erkennbare Ursache angegeben werden könnte. Nach dem Ergebnis dieser Voruntersuchungen wurden für die Gesamtauswertung die einzelnen Rückkreuzungen getrennt verwendet und als Wiederholung der Prüfung einer F_1 gewertet.

Tabelle 13. *Auftreten der Restkomplexe flavens und ^{h}Hookeri in den Eizellen verschiedener F_1-Kombinationen, getestet an der Spaltung der Nachkommenschaft*

Nr.	F_1 (vgl. Tabelle 10) Formel	Restkomplex		Σ
		flavens	^{h}*Hookeri*	
a) Zusammenfassung aller Testkreuzungen jeder Kombination				
1	fl ⊦ · H+	97	102	199
2	fl+ · Hs	104	143	247
3	fl s · H+	130	179	309
4	fl s · Hs	98	127	225
5	H+ · fl+	71	110	181
6	Hs · fl+	41	99	140
7	H+ · fl s	65	89	154
8	Hs · fl s	8	8	16
b) Zusammenfassung der reziproken Kombinationen				
1+5	fl ⊦ mit H+	168	212	380
2+6	fl ⊦ mit Hs	145	242	387
3+7	fl s mit H+	195	268	463
4+8	fl s mit Hs	106	135	241
	Σ	614	857	1471

c) Spaltungen der drei Testloci. Zunächst sollen die Spaltungen der drei Testloci getrennt betrachtet werden. Die meisten Daten liegen für die Spaltung nach den beiden Restkomplexen vor, weil hierfür alle Rückkreuzungen ohne Rücksicht auf Homozygotie oder Heterozygotie in einzelnen Loci oder auf die Konstitution der Testkomplexe verwendet werden können. In den einzelnen Rückkreuzungen schwankt die Spaltung zwischen einer Übereinstimmung mit der

Tabelle 14a. *Homogenitätstest für das Auftreten der Restkomplexe flavens (Chromosomen 1·4, 3·2) und ^{h}Hookeri (1·2, 3·4) in den Eizellen der F_1 verschiedener Kombinationen dieser Komplexe mit den Allelen s und $+^{s}$.*
(Nach Daten der Tabelle 10, Spalte 7 und Tabelle 13)

Variationsursache	χ^2	n	P
Total	94,82	20	—
Spaltung 1:1	40,14	1	$<0{,}001$
Homogenität total	54,68	19	$<0{,}001$
Zwischen den acht F_1-Kombinationen	13,82	7	0,1—0,05
Zwischen den vier Komplexkombinationen	4,27	3	0,3—0,2
Zwischen reziproken Kombinationen	9,55	4	0,05—0,02
Zwischen verschiedenen Nachkommenschaften derselben F_1-Kombination (= Rest)	40,86	12	$<0{,}001$

Erwartung 1:1 bis zu einem gesicherten Überwiegen von ^{h}*Hookeri*. In keinem Fall wurde ein gesichertes Überwiegen von *flavens* gefunden. Die Summenwerte aus der Zusammenfassung der einzelnen Testkreuzungen jeder F_1 sind in Tabelle 13 gegeben, die χ^2-Analyse in Tabelle 14a. Insgesamt ist die Abweichung von der Erwartung einer 1:1-Spaltung durch das Überwiegen von ^{h}*Hookeri* über *flavens* gesichert. Die Spaltungszahlen der einzelnen Rückkreuzungen können nicht als zufällige Varianten des durchschnittlichen Spaltungsverhältnisses angesehen werden. Für die Homogenität ist $P<0{,}001$. Die Aufgliederung in die einzelnen möglichen Variationsursachen zeigt, daß dieser mangelnden Übereinstimmung keine systematischen Ursachen zugrunde liegen. Weder zwischen den Summenwerten der acht F_1-Kombinationen noch zwischen den vier verschiedenen Genkomplexkombinationen oder zwischen je zwei reziproken Kombinationen sind gesicherte Unterschiede vorhanden. Auch ein Einfluß bestimmter Testkomplexe ist nicht nachzuweisen. Eine selektive Befruchtung, bei der eine Gleichartigkeit in einem Allel oder einem Komplex zwischen der Eizelle und einem bestimmten Pollenschlauch fördernd oder hemmend auf die Befruchtung wirken könnte, ist also sicher auszuschließen.

Nur die Reststreuung, die ein Maß für die Differenzen zwischen verschiedenen Nachkommenschaften der gleichen F_1 ist, ist gesichert größer, als zufällig möglich wäre. Diese Variabilität der Konkurrenzverhältnisse in der Samenanlage wurde auch in früheren Untersuchungen mit anderen Testloci bereits gefunden (HARTE 1958). Die wichtigste Beobachtung ist aber, daß immer der Restkomplex ^{h}*Hookeri* bevorzugt in der Eizelle auftritt, unabhängig davon, mit welchem *s*-Allel er in die F_1 eingegangen ist.

In denselben Rückkreuzungen konnte auch die Spaltung für die Blütenfarbe ausgezählt werden, sofern die F_1 für $s/+^{s}$ heterozygot war und der Testkomplex das Allel *s* enthielt. Hierfür stehen insgesamt sieben Nachkommenschaften von vier F_1-Kombinationen zur Verfügung (Tabelle 10, Spalte 5). Als erstes fällt auf, daß das Verhältnis von gelb:*sulfurea* sehr stark variiert. Das Defizit betrifft nicht immer eine bestimmte Blütenfarbklasse, sondern es kann sowohl $+^{s}$ wie *s* benachteiligt sein. Wenn die Spaltung jedoch in Beziehung gesetzt wird zu der genischen Konstitution der beiden in der F_1 vereinigten Komplexe, zeigt sich, daß bei einer gesicherten Abweichung von der Erwartung immer das Allel benach-

Tabelle 14b. *Homogenitätstest für das Auftreten der Allele s und $+^s$ in den Eizellen von verschiedenen F_1-Kombinationen dieser Allele mit den Komplexen flavens und ^{h}Hookeri*
(Nach Daten der Tabelle 10, Spalte 5, Zeile 1—8)

Variationsursache	n	1. Einordnung nach der Blütenfarbe der Rückkreuzungspflanzen (Gegensatz gelb-*sulfurea*)		2. Einordnung nach der Herkunft der Allele aus der P-Generation (Gegensatz *flavens*-^{h}*Hookeri*)	
		χ^2	P	χ^2	P
Total	7	36,79	—	36,79	—
Spaltung 1:1. . . .	1	0,0008	$>0{,}9$	11,37	$<0{,}001$
Homogenität total	6	36,78	$<0{,}001$	25,42	$<0{,}001$
Zwischen F_1-Kombinationen.	3	30,99	$<0{,}001$	19,63	$<0{,}001$
Zwischen *suaveolens*- und *Hookeri*-Plasma	1	0,70	0,5—0,3	18,57	$<0{,}001$
Zwischen komplementären F_1 in gleichem Plasma .	2	30,29	0,001	1,06	0,7—0,5
Zwischen mehreren Testkreuzungen derselben F_1 . . .	3	5,79	0,2—0,1	5,79	0,2—0,1

teiligt ist, das zusammen mit *flavens* in die Kreuzung einging, während das mit ^{h}*Hookeri* gekoppelte Allel bevorzugt ist (Tabelle 14b).

Darüber hinaus ist festzustellen, daß immer dann, wenn *suaveolens* der ♀ Kreuzungselter war, das Spaltungsverhältnis angenähert 1:1 ist, während im *Hookeri*-Plasma das aus ^{h}*Hookeri* stammende Allel häufiger in der Nachkommenschaft auftritt. Die statistische Analyse der Daten bestätigt diesen Eindruck (Tabelle 14b). Bei Einordnung nach der Blütenfarbe (1. Analyse) kommt in der Summe zwar eine Übereinstimmung mit der Erwartung 1:1 zustande, aber nur dadurch, daß sich bei sehr starker Inhomogenität die positiven und negativen Abweichungen ungefähr die Waage halten. Die Aufgliederung des Faktors „Homogenität" in die einzelnen Komponenten zeigt, daß mehrere Testkreuzungen einer F_1 jeweils gut übereinstimmen, während zwischen F_1-Kombinationen gesicherte Unterschiede vorhanden sind. Der Hauptanteil hiervon entfällt wiederum auf Differenzen zwischen komplementären F_1-Bastarden, während zwischen Bastarden im *suaveolens*- und im *Hookeri*-Plasma beim Vergleich der Summen dieser Gruppen keine Unterschiede zu sichern sind. Diese Übereinstimmung ist aber nur scheinbar, da die Summen durch Addition sehr ungleicher Einzelspaltungen zustande kommen. Bei Anordnung nach der Herkunft der Allele aus *flavens* oder ^{h}*Hookeri* (2. Analyse) ist die Gesamtabweichung von der Erwartung 1:1 gesichert, und zwar durch Überwiegen der *Hookeri*-Anteils. Es besteht eine gesicherte Inhomogenität, die aber nicht so groß ist wie bei der ersten Analyse. Die Zerlegung des Faktors „Homogenität zwischen F_1-Kombinationen" ergibt schließlich, daß

Tabelle 14c. *Homogenitätstest für das Auftreten der Allele $+^{de}$ (aus flavens) und de (aus ^{h}Hookeri) in den Eizellen verschiedener F_1-Kombinationen dieser Komplexe mit den Allelen s und $+^s$*
(Nach Daten der Tabelle 10, Spalte 6)

Variationsursache	χ^2	n	P
Gesamtanalyse			
Total	158,09	6	
Spaltung 1:1 . .	136,60	1	$\ll 0{,}001$
Homogenität . .	21,49	5	$<0{,}001$

Tabelle 15. *Rekombination zwischen den drei Testloci* (Aufgliederung der Daten aus Tabelle 10)*

a) Zweipunktklassifikation

I. Komplex-*de*

Lfd. Nr. aus Tabelle 10	F_1	Konstitution der Eizellen der F_1			
		Austauschklassen			
		P	1	1	P**
		Restkomplex			
		flavens		^{h}*Hookeri*	
		Allel			
		$+^{de}$	*de*	$+^{de}$	*de*
1a	fl$+^{s}$ · H$+^{s}$	31	20	16	37
2a	fl$+^{s}$ · Hs	19	27	3	53
3b	fl s · H$+^{s}$	16	21	5	55
4a	fl s · Hs	30	23	11	41
5a	H$+^{s}$ · fl$+^{s}$	23	30	5	64
7a	H$+^{s}$ · fl s	30	24	1	72

II. Komplex-*s*

		Allel			
		$+^{s}$	*s*	$+^{s}$	*s*
2a	fl$+^{s}$ · Hs	39	7	—	56
2b	fl$+^{s}$ · Hs	37	9	30	60
6	Hs · fl$+^{s}$	37	4	1	97
		Allel			
		s	$+^{s}$	*s*	$+^{s}$
3c	fl s · H$+^{s}$	13	—	4	25
3d	fl s · H$+^{s}$	52	1	2	57
7a	H$+^{s}$ · fl s	45	9	3	70
7b	H$+^{s}$ · fl s	2	—	—	12

III. *s*—*de*

		Allele			
		$+^{de}$		*de*	
		$+^{s}$	*s*	$+^{s}$	*s*
2a	fl $+^{s}$ · Hs	18	7	22	67
		Allel			
		s	$+^{s}$	*s*	$+^{s}$
7a	H$+^{s}$ · fl s	28	6	30	89

* Es sind nur die Pflanzen aufgenommen, die für alle zwei bzw. drei aufgeführten Merkmale eindeutig klassifiziert werden konnten. Pflanzen, bei denen die Bestimmung eines Merkmals ausfiel, sind hier nicht berücksichtigt. Die Summe ist daher geringer als die Summen für die Einordnung nach Einzelmerkmalen in Tabelle 10.

** P = Elternkombinationen; 1 = crossing-over-Klassen in I zwischen T—*de*, in II zwischen T—*s*; in III zwischen *de*—*s*.

Tabelle 15 (Fortsetzung)

Lfd. Nr. aus Tabelle 10	F_1	Konstitution der Eizellen der F_1							
b) Dreipunktklassifikation: Komplex, *s* und *de*									
		Austauschklassen							
		P	1	2	3	3	2	1	P***
		Restkomplex							
		flavens				^{h}*Hookeri*			
		Allele							
		$+^{s}$		*s*		$+^{s}$		*s*	
		$+^{de}$	*de*	$+^{de}$	*de*	$+^{de}$	*de*	$+^{de}$	*de*
2a	fl $+^{s}$ · Hs	18	21	1	6	—	—	3	53
		Allele							
		s		$+^{s}$		*s*		$+^{s}$	
		$+^{de}$	*de*	$+^{de}$	*de*	$+^{de}$	*de*	$+^{de}$	*de*
7a	H $+^{s}$ · fl	26	19	4	5	—	3	1	69

*** P = Elternkombinationen; Austauschklasse 1 = einfaches crossing-over zwischen *de* und (*s*—T); Austauschklasse 2 = doppeltes crossing-over auf den Strecken *de*—*s* und *s*—T oder einfaches zwischen *s* und (T—*de*); Austauschklasse 3 = einfaches crossing-over zwischen (*de*—*s*) und T oder doppeltes zwischen *s*—T und T—*de*.

die Nachkommenschaften komplementärer F_1 im gleichen Plasma sehr gut übereinstimmen, während der Einfluß des ♀ Kreuzungselters, der das Plasma lieferte, gesichert erscheint. Da bei dieser Art der Analyse in den Endstufen keine inhomogenen Werte addiert werden, stellt sie die richtige Auswertung der Daten dar. Die Ursache für die Inhomogenität der Spaltungsergebnisse liegt also in einer Benachteiligung des *flavens*-Allels im *Hookeri*-Plasma.

Die Spaltung nach der Gipfelform (flacher oder spitzer Gipfel) wurde in sechs Rückkreuzungen ausgewertet. Die Abweichung von der Erwartung einer 1:1-Spaltung ist viel stärker als bei den beiden anderen Testloci. Immer sind die Pflanzen mit einem breiten, flachen Gipfel in der Überzahl. Das hierfür verantwortliche Allel *de* ist in allen Kreuzungen mit ^{h}*Hookeri* in die F_1-Generation eingegangen. Das Ausmaß des Überwiegens von *de* über $+^{de}$ in der Eizelle ist in den einzelnen Rückkreuzungen gesichert verschieden, ohne daß hierfür bestimmte Ursachen angegeben werden können. Weder die Herkunft von ^{h}*Hookeri* als ♀ oder ♂ Elter der F_1 noch die Koppelung dieses Komplexes mit einem der beiden Allele des *s*-Locus haben einen Einfluß auf die Spaltung. Es ist aber eindeutig, daß trotz dieser Variabilität die Konkurrenz zwischen den Gonen verschiedener genetischer Konstitution bei Verwendung von *de* als Testlocus am deutlichsten hervortritt.

d) Zweipunktversuche. In neun Rückkreuzungen wurden zwei Merkmale an denselben Pflanzen bestimmt, so daß eine Auswertung als Zweipunktversuch möglich ist. Hierbei lassen sich die Nachkommen in vier Klassen einteilen, von denen zwei den Elternkombinationen entsprechen und zwei Austauschklassen

darstellen, die auf ein crossing-over auf der Strecke zwischen den Testloci während der Meiosis bei der Bildung der Gonen auf den F_1-Pflanzen zurückgehen (Tabelle 15).

Bei einer Klassifikation nach den Testloci T *de* (Tabelle 15a I) zeigt es sich, daß bei den Elternklassen die Kombination *Hookeri de* überwiegt gegen *flavens* $+^{dc}$. Unter den Austauschklassen ist dagegen *flavens de* überlegen. Die Bevorzugung geht also mit *de* zusammen von einem Restkomplex auf den anderen über. In der Klassifikation nach T—*s* ist unter den Elternklassen ^{h}*Hookeri* am häufigsten, während die crossing-over-Klassen, soweit bei dem geringen Austausch auf dieser Strecke eine Aussage möglich ist, keine Bevorzugung erkennen lassen (Tabelle 15a II). Bei der Einteilung nach *s*—*de* (Tabelle 15a III) ist sowohl unter den Eltern- wie unter den Austauschklassen jeweils *de* bevorzugt, unabhängig davon, ob in der F_1 *s* in der Koppelungs- oder Abstoßungsphase vorliegt. Bei einem Austausch auf dieser Strecke geht also die Bevorzugung zusammen mit *de* und ist vom *s*-Locus unabhängig.

c) Dreipunktversuche. Die zwei Rückkreuzungen, für die eine Auszählung aller drei Merkmale durchgeführt wurde, geben Aufschluß über weitere Einzelheiten. Die Reihenfolge der drei Loci T, *s* und *de* ist bisher nicht genau bekannt. Crossing-over-Werte lassen sich nicht berechnen, weil die Verschiebung der Spaltungszahlen durch die Konkurrenz eine genaue Bestimmung unmöglich macht. Als Anhaltspunkt lassen sich nur die Anteile der Pflanzen in den Austauschklassen angeben. Für den Dreipunktversuch betragen diese für den Austausch auf der Strecke T—*de* 24,0%, zwischen T—*s* 8,3% und zwischen *de*—*s* 24,3%. Dies ist sowohl mit der Reihenfolge T—*s*—*de* wie *de*—T—*s* in Einklang zu bringen. Mangels genauer Kenntnis über die Wahrscheinlichkeit eines crossing-over auf den zwei Teststrecken zwischen den drei Loci können keine Annahmen über die zu erwartende Häufigkeit des einfachen und doppelten Austausches und der relativen Häufigkeit der möglichen Genkombinationen in den Gonen gemacht werden. Es kann jedoch mit Sicherheit gesagt werden, daß jeweils reziproke Kombinationen mit gleicher Wahrscheinlichkeit auftreten müssen. Wenn sie sich in der Nachkommenschaft nicht mit gleicher Häufigkeit nachweisen lassen, kann dies als Folge der Konkurrenz zwischen den Gonen angesehen werden.

Die beobachteten Spaltungszahlen der Dreipunktversuche enthält Tabelle 15b. Für die Vergleiche zwischen den beiden Elternkombinationen ergibt sich wieder, daß ^{h}*Hookeri* bevorzugt ist, zusammen mit *de* und unabhängig von *s* bzw. $+^{s}$. Ein Austausch von *de*, also einfaches crossing-over, auf der Strecke zwischen *de* und (T —*s*) findet relativ häufig statt. Dann ist die Kombination *flavens*—*de* bevorzugt gegenüber ^{h}*Hookeri*—$+^{dc}$ (Austauschklassen 1). Die Bevorzugung hängt also nicht am Restkomplex (= Nähe des Translokationspunktes), sondern geht zusammen mit *de* auf den anderen Komplex über. Wenn sowohl *de* als auch *s* gegen T ausgetauscht werden, geht die Bevorzugung ebenfalls mit. Dies könnte zunächst so aussehen, als ob der Einfluß auf die Konkurrenz vom Locus *de* ausgehen würde. Wird aber nur *s* gegen (T —*de*) ausgetauscht, so sind beide Austauschklassen gleich häufig vertreten.

f) Deutung. Wenn man die Reihenfolge T—*s*—*de* als richtig annimmt, sprechen diese Spaltungszahlen dafür, daß die Konkurrenz nicht von *de* selber beeinflußt wird, sondern von einem mit *de* eng gekoppelten Locus *k* (Konkurrenzgen), der durch crossing-over von *de* ge-

trennt werden kann. Da bekannt ist, daß *s* ziemlich nahe an *T* liegt, kann dann angenommen werden, daß auf Grund der Interferenz bei einem crossing-over zwischen *s*—T der nächste Austausch in einiger Entfernung von *s* erfolgt, also auf der Strecke *de*—*s* relativ nahe an *de* liegen wird. Die vermutliche Lage von *k* wäre zwischen *de* und *s* anzunehmen, ziemlich nahe an *de*, so daß der Locus meist zusammen mit *de* manövriert und nur, wenn durch ein doppeltes crossing-over infolge der Interferenz der Austausch auf der Strecke *de*—*s* nahe an *de* erfolgt, von diesem getrennt wird. Als Folge der geringen Individuenzahl in den beiden für die Deutung entscheidenden Austauschklassen ist diese Lokalisation jedoch noch als hypothetisch anzusehen.

D. Diskussion

I. Konkurrenz in der Samenanlage bei der Bildung des Embryosacks

Bei den früheren Untersuchungen (Harte 1958a, b, c) war es von vornherein klar, daß die Letalfaktoren nur als Markierungsgene dienten und der Einfluß auf die Konkurrenz von den jeweils in der Kombination vereinigten Komplexen ausging. Dabei blieb es offen, ob die Überlegenheit eines Komplexes über einen anderen, d.h. seine Fähigkeit, bei Anwesenheit im Kern einer Gone diese mit großer Wahrscheinlichkeit zur Bildung des Embryosacks zu bringen, von der Gesamtheit der zu einem Komplex vereinigten Gene oder von einzelnen Loci bestimmt wird. Bei der Verwendung von Arten und Bastarden mit starker Verkettung der Chromosomen, durch die die Gene der Komplexe zusammengehalten werden, kann hierüber auch keine nähere Auskunft erhalten werden. In älteren Untersuchungen (Zusammenfassung Harte 1948, 1953) war bereits festgestellt, daß bestimmte Loci, nämlich *s* und *fr*, Störungen der Spaltungszahlen nach Selbstung und Rückkreuzung ergeben, die als Folge einer Konkurrenz zwischen Gonen mit verschiedenen Allelen dieser Loci gedeutet wurden.

Die jetzt vorliegenden neuen Befunde zeigen jedoch deutlich, vor allem in der Kombination *flavens*·^{h}*Hookeri*, daß von den Allelen *s* und $+^{s}$ keine direkte Wirkung auf die Konkurrenz zwischen den Makrosporen um die Bildung des Embryosacks ausgeht, sondern daß in einer Koppelungsgruppe zusammen mit *s* ein anderes Gen vorhanden ist, dessen Allele nur gametophytisch wirksam sind. Es fragt sich aber, ob dies die Loci *de* oder *fr*, die derselben Koppelungsgruppe angehören, sein können. Die Ergebnisse des Dreipunktversuchs lassen für die Allele *de* und $+^{de}$ vermuten, daß auch diese nicht direkt beteiligt sind. Schließlich sind die Untersuchungen mit *fr* als Testgen, vor allem wenn die Ergebnisse der Kombination (*flavens*·^{h}*Hookeri*)·*stringens* berücksichtigt werden, am einfachsten zu deuten, wenn auch hier angenommen wird, daß ein Locus, dessen Allele für die Konkurrenz verantwortlich sind, mit *fr* zur gleichen Koppelungsgruppe gehört. Gegen eine direkte Beteiligung von *de* und $+^{de}$ spricht auch, daß in der Kombination ^{h}*Hookeri*·*stringens* beide Komplexe *de* enthalten, aber doch eine starke Konkurrenz festzustellen ist. Die Kombination *flavens*·^{h}*Hookeri* ist dagegen für $+^{fr}$ homozygot, aber auch hier besteht eine Konkurrenz unter dem Einfluß eines Locus dieser Koppelungsgruppe.

Es besteht hier allerdings die Möglichkeit, anzunehmen, daß am Locus *fr* drei Allele vorliegen, von denen eines sporophytisch Pollenfertilität und gametophytisch gute Konkurrenzfähigkeit bedingt (in ^{h}*Hookeri*), das zweite ebenfalls Fertilität, aber verbunden mit geringer Konkurrenzfähigkeit (in *flavens*) und das dritte schließlich Pollensterilität und geringe Konkurrenzfähigkeit bewirkt (in *stringens*). Entsprechendes könnte auch für den *de*-Locus formuliert werden. Bei Berücksichtigung dieser Möglichkeiten liegt es nahe, ein Komplexgen mit zwei Anteilen von unterschiedlichem Wirkungsbereich anzunehmen, so daß es nur eine

Frage der Bezeichnung ist und praktisch nur von der Häufigkeit des crossing-over bestimmt wird, ob auch von zwei gekoppelten Loci gesprochen werden kann.

Es fragt sich also nur, ob die in verschiedenen Kreuzungen nachgewiesenen Konkurrenzgene, die mit *de* bzw. *fr* gekoppelt sind, identisch sind oder ob in dieser Koppelungsgruppe mit den Chromosomenenden 1–4 zwei solcher gametophytisch wirksamer Gene vorhanden sind. Die einzige direkt herstellbare Kombination, die sowohl für *fr* wie für *de* heterozygot ist, nämlich *flavens·stringens*, kann nicht zur Entscheidung herangezogen werden, weil hier die Konkurrenz bei der Bildung des Embryosacks so stark von einem Gen in der Koppelungsgruppe der Chromosomenenden 5—6—13—14 bestimmt wird, daß die eventuelle Wirkung eines weiteren in der ersten Koppelungsgruppe gelegenen Gens demgegenüber nicht erkennbar ist.

Wenn aus den verschiedenen Testkreuzungen der Serie *^{h}Hookeri · stringens* die Häufigkeit verglichen wird, mit der *+^{s}* und *fr* aus *stringens* noch im Embryosack auftreten, so zeigt sich, daß *+^{s}* in etwa 28% der Eizellen vorhanden ist, *fr* dagegen nur in etwa 10%. Wenn weiter angenommen wird, daß das Verhältnis des Auftretens der beiden Allele eines Gens in der Eizelle u. a. abhängt von der Häufigkeit des crossing-over zwischen dem Testlocus und dem Konkurrenzlocus, ergibt sich daraus, daß der letztere näher an *fr* als an *s* zu lokalisieren ist. In den Dreipunktversuchen ergab sich eine wahrscheinliche Lokalisation des Konkurrenzgens näher an *de* als an T *s*. Da über die gegenseitige Lage von *fr* und *de* nichts bekannt ist, kann von dieser Seite her ebenfalls vorläufig nichts zur Entscheidung der Frage, ob ein oder zwei Loci in Betracht gezogen werden müssen, beigetragen werden.

Es lassen sich demnach komplizierte Hypothesen formulieren über die Möglichkeit von Serien multipler Allele mit unterschiedlicher Wirkung im Sporophyten und Gametophyten oder über Polymerie mit mehreren Loci in einer Gruppe; aber die einfachste Erklärung, ohne unbewiesene Zusatzannahmen, ist doch, daß in dieser Koppelungsgruppe ein Locus mit gametophytischer Wirkung vorhanden ist. Es spricht also nichts dagegen, zunächst diese einfachste Hypothese anzunehmen, nämlich, daß ein einzelnes Gen in der ersten Koppelungsgruppe gametophytisch wirksam ist in der Weise, daß seine Allele eine unterschiedliche Konkurrenzfähigkeit der vier Gonen einer Tetrade bedingen und so in die Entscheidung darüber, welche von ihnen die Bildung des Embryosacks übernehmen soll, eingreifen. Dabei ist das stärkste Allel in *^{h}Hookeri* enthalten, das schwächste in *stringens*, während *flavens* entweder das gleiche Allel wie *stringens* enthält oder ein weiteres schwaches Allel, das gegenüber demjenigen aus *^{h}Hookeri* deutlich unterlegen ist.

Es liegt die Versuchung nahe, aus der relativen Konkurrenzstärke in verschiedenen Komplexkombinationen eine Reihe der Wirkungsstärke aufzustellen und diese zur Grundlage der Annahme einer Serie multipler Allele am Konkurrenzlocus mit abgestufter Wirkung zu machen. Von Interesse ist dabei die Beobachtung, daß die Konkurrenz zwischen den Restkomplexen *flavens* und *^{h}Hookeri* plasmonabhängig ist, wie aus dem Vergleich der reziproken Kreuzungen hervorgeht. Dadurch wird die Aufstellung einer Abstufungsreihe der relativen Stärke der Konkurrenzfähigkeit der einzelnen Komplexe weiter erschwert, was wiederum den Versuch, die Anzahl der Allele eines Konkurrenzgens zu bestimmen, zunächst vereitelt. Bei einem solchen Versuch ist auch in anderer Hinsicht Vorsicht geboten. Wie schon früher dargelegt wurde (HARTE 1958c), können zwei Möglichkeiten zur Erklärung der Wirkung eines solchen Konkurrenzgens herangezogen

werden. Einmal können die Allele direkt in den Gonen wirken und ihre Vitalität beeinflussen, wobei dann eine direkte Konkurrenz zwischen diesen Zellen eintritt und die stärkste Zelle der Tetrade gewinnt, zum andern könnte aber jede einzelne Gone zunächst zu der Mutterpflanze in Beziehung treten, wobei Gonen mit einem bestimmten Allel auf einer Pflanze gegebener Konstitution gehemmt werden, so daß eine der Inkompatibilität vergleichbare Situation gegeben wäre.

Die Frage, ob hier multiple Allelie mit abgestufter Wirkung vorliegen könnte, läßt sich auf Grund des vorliegenden Materials nicht beantworten. Sicher ist jedoch, daß es bei den Oenotheren in den bisher untersuchten Komplexen mindestens in zwei Koppelungsgruppen Gene gibt, die gametophytisch bei der Entwicklung des Embryosacks wirksam sind.

II. Pollenschlauchkonkurrenz

Für die Pollenschlauchkonkurrenz können hier nur einige ergänzende Befunde mitgeteilt werden. In ^{h}*Hookeri·stringens* sind die durch *fr* markierten Pollenschläuche sehr stark benachteiligt, während die Anwesenheit von *s* oder $+^{s}$ ohne Einfluß ist. Aus früheren Kreuzungen war bekannt, daß sowohl *flavens* wie *stringens* gegenüber ^{h}*Hookeri* unterlegen ist, während in der Nachkommenschaft von *flavens·stringens* keine Konkurrenz zwischen den verschiedenen Allelenkombinationen in der ersten Koppelungsgruppe festgestellt werden konnte. In der Nachkommenschaft von *(flavens·*^{h}*Hookeri)·stringens* traten nun sowohl Spaltungsverhältnisse auf, die der Kombination *flavens·stringens*, wie solche, die ^{h}*Hookeri·stringens* entsprechen, so daß ein Austausch der für die Pollenschlauchkonkurrenz verantwortlichen Gene zwischen *flavens* und ^{h}*Hookeri* stattgefunden haben muß. Im vorliegenden Material bleibt es aber offen, ob das Gen, das hier wirksam wird, identisch ist mit demjenigen, daß auf die Konkurrenzfähigkeit der Eizelle einwirkt, oder ob für die Wirkung in den beiden verschiedenen Gametophyten auch getrennte Loci angenommen werden müssen, die dann zur gleichen Koppelungsgruppe gehören würden. Daß einer Wirkung auf die Embryosackentwicklung nicht unbedingt auch eine gleichartige Wirkung auf den Pollenschlauch entsprechen muß, ergibt sich aus der Tatsache, daß das Gen, das in den *stringens*-Chromosomen 5—6—13—14 die fast völlige Unterdrückung im Embryosack sowohl gegenüber *flavens*, wie gegenüber ^{h}*Hookeri* bewirkt, bei Prüfung des Pollens eine völlig den Erwartungen entsprechende 1:1-Spaltung der *flavens*- und *stringens*-Anteile dieses Chromosomenringes zuläßt.

Zusammenfassung

1. Es wurden verschiedene Kombinationen von *flavens*, *stringens* und ^{h}*Hookeri* sowie ^{h}*Hookeri*-ähnlichen Komplexen hergestellt und an der Nachkommenschaft die Gonenkonkurrenz in Embryosack und Pollenschläuchen unter Verwendung von *s*, *fr*, *de* und den Translokationspunkten als Testloci geprüft.

2. Von den verwendeten Testloci sind *s* sicher, *fr* und *de* mit großer Wahrscheinlichkeit nicht gametophytisch wirksam.

3. In der Koppelungsgruppe der Chromosomenenden 1—2—3—4 muß die Anwesenheit eines gametophytisch wirksamen Gens angenommen werden, dessen Allele eine unterschiedliche Konkurrenzfähigkeit der Gonen bei der Bildung des Embryosacks bewirken.

4. Das stärkste Allel ist in ^{h}*Hookeri* enthalten, das schwächste in *stringens*, während es offenbleibt, ob *flavens* mit *stringens* übereinstimmt oder ein weiteres Allel enthält.

5. Die Wirkung der beiden Allele des Konkurrenzgens in *flavens*·^{h}*Hookeri* ist plasmonabhängig.

6. In der Koppelungsgruppe der Chromosomenenden 5—6—13—14 ist ein weiteres gametophytisch wirksames Gen enthalten, wobei *flavens* und ^{h}*Hookeri* übereinstimmend ein starkes Allel, *stringens* ein schwaches Allel enthalten.

7. In der ersten Koppelungsgruppe ist ein Gen vorhanden mit einem starken Allel in ^{h}*Hookeri* und einem schwachen in *flavens* und *stringens*, das auf das Pollenschlauchwachstum einwirkt. Es bleibt offen, ob dieses Gen identisch ist mit demjenigen, das auf die Entwicklung des Embryosacks einwirkt.

8. Das in der zweiten Koppelungsgruppe enthaltene, gametophytisch im Embryosack wirksame Gen hat keinen Einfluß auf das Pollenschlauchwachstum.

Literatur

Harte, C.: Cytologisch-genetische Untersuchungen an spaltenden Oenotheren-Bastarden. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **82**, 495—640 (1948).

— Untersuchungen über Gonenkonkurrenz und crossing-over bei spaltenden Oenothera-Bastarden. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **85**, 97—117 (1953).

— Untersuchungen über die Gonenkonkurrenz in der Samenanlage bei *Oenothera* unter Verwendung der Letalfaktoren als Markierungsgene. I. Mitt. Die individuelle Komponente der Variabilität. Z. Vererbungslehre **89**, 473—496 (1958); — II. Mitt. Die Umweltkomponente der Variabilität. Z. Vererbungslehre **89**, 497—507 (1958); — III. Mitt. Die genetische Komponente der Variabilität. Z. Vererbungslehre **89**, 715—728 (1958).

Professor Dr. Cornelia Harte,
Institut für Entwicklungsphysiologie, Universität zu Köln,
Köln-Lindenthal/Rhein, Gyrhofstraße 17

Zeitschrift für Vererbungslehre 92, 165—182 (1961)

M.R.C. Induced Mutagenesis Group Institute of Animal Genetics, University of Edinburgh

A CHEMICALLY-INDUCED VARIEGATED-TYPE POSITION EFFECT IN THE MOUSE

By

Bruce M. Cattanach*

With 3 Figures in the Text

(Received May 12, 1961)

Introduction

It is now a well-established fact that the effect of a gene may be dependent upon its position with respect to neighbouring genes. There are many examples of this position effect (Sturtevant 1925) in *Drosophila* and there is also a similar case in *Oenothera* (see review by Lewis 1950). Most of the position effects are a consequence of rearrangements involving heterochromatic and euchromatic regions of chromosomes and result in a type of mosaicism for the effects of genes lying close to the breakage point. Such position effects have been denoted as variegated—or V-type position effects (Lewis 1950).

Until recently examples of this phenomenon have been restricted to *Drosophila*, *Oenothera*, and perhaps also maize (McClintock 1956), but recently a case of a V-type position effect has been described in the mouse (Russell and Bangham 1959). The inheritance of a brown-mottled condition in female mice indicated that such animals were heterozygous for a reciprocal translocation between the X-chromosome and an autosome (linkage group VIII), the break in the autosome being close to the "brown" locus which carried the wild type allele. A similar case involving another autosome (linkage group I) was also described.

In the present paper evidence for a further example of a V-type position effect in the mouse will be presented. This case resembles those of Russell and Bangham (1959) in that a translocation between the X-chromosome and an autosome is involved, but differs in several features which make it worthy of particular study.

Origin and First Crosses

The first mutant animal appeared in a mutation experiment in which the chemical triethylenemelamine (TEM) was employed as the mutagenic agent. The specific loci method, described by Russell (1951, 1952, 1956), and Carter *et al.* (1956) was used for detecting mutations. Treated wild type CBA males were crossed with a series of PCT stock females that were homozygous for seven recessive genes [*non-agouti* (*a*), *brown* (*b*), *pink-eye* (*p*), *chinchilla* (c^{ch}), *short-ear* (*se*), *dilute* (*d*) and *piebald* or *pied* (*s*)], and the F_1 were classified for visible mutations i.e. dominant mutations, or alleles of any of the seven recessives. The dose of TEM administered was 0.2 mg TEM/kg body weight.

The mutant animal, which was a female, appeared in the F_1 of such a cross. It was denoted "*flecked*" (*fd*) as its phenotype was that of a white variegated pattern on an otherwise wild type coat colour. The animal was conceived eight

* Medical Research Council Staff.

days after TEM had been administered to the father, and thus was derived from a spermatozoon that had been mature at the time of treatment.

The appearance of the variant animal in an F_1 generation suggested that either a dominant mutation or a mutant allele of one of the seven recessives in the PCT stock had been produced. The test-matings, shown diagrammatically in Fig. 1, were therefore carried out.

Cross 1. The original *fd* female was back-crossed to a wild type CBA male. 37 offspring (22 ♀♀, 15 ♂♂) were produced in seven litters. All were wild type. The mutant character cannot therefore be inherited as a dominant, but may be allelic with one of the colour genes such as *pied* (*s*).

Cross 2. 15 F_2 males were intercrossed with 18 F_2 females, and it was found that the variant character reappeared in crosses of 4 males with 8 females. Four

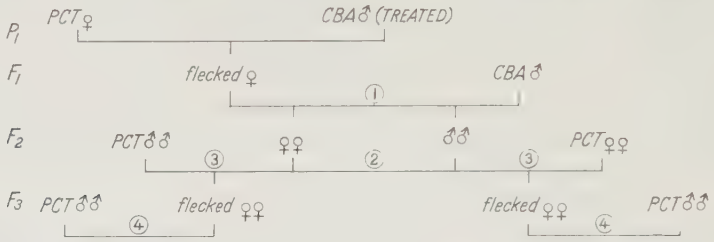


Fig. 1. Diagrammatical representation of the crosses carried out to determine the mode of inheritance of *fd*

males proved to be completely sterile. The following information was also obtained. Only females exhibit the character, there was no disturbance of the sex-ratio, and the character was found in combination with all the recessive genes except *pink-eye* and *chinchilla*. That is to say, the non-white portions of the coat of *fd* animals never showed the *pink-eye* or *chinchilla* phenotypes.

The results suggest that *fd* is sex-limited, but that *fd* is not allelic with *pied* or any of the other genes apart from, possibly, *pink-eye* and *chinchilla*. The absence of any pc^{ch} *fd* animals can be partly explained by the fact that *pink-eye* and *chinchilla* are closely linked [14 crossover units (GREEN and DICKIE 1959)], and together produce an almost white phenotype on which the *flecked* phenotype would not be classifiable. Crossovers between the two genes did, however, occur but in no instance was the variant character seen in combination with either gene. Some connection between *fd* and the two genes was therefore suspected.

Cross 3. 19 F_2 males and 8 F_2 females were backcrossed to PCT animals. Of these, two males and four females produced *fd* daughters. *Pink-eye* and *chinchilla* segregated in all matings, but no crossovers between the two genes was observed among the progeny of those animals which produced *fd* offspring.

The results indicate that both *pink-eye* and *chinchilla* are associated with the occurrence of *fd*, and that a rearrangement involving the *pink-eye* and *chinchilla* loci is probably the cause of the lack of crossing over between the two genes. The results further show that males as well as females are capable of transmitting the character. This means that males with the equivalent genotype to *fd* females do not exhibit the *flecked* phenotype.

Cross 4. Flecked females, obtained in crosses 2 and 3, were backcrossed to PCT males, and the cross was repeated with the *fd* daughters that were produced. As in the previous crosses, *fd* was found in combination with all the recessive genes except *pink-eye* and *chinchilla*, and no crossing over was observed between these two genes. The results therefore complement the results of the previous crosses.

The classification of the progeny of this cross is illustrated in Table 1. Several peculiarities are apparent:

Table 1. *The cross of fd females with PCT ♂♂ over two generations*

Matings	No. females	No. litters	Sex-ratio at birth	Av. litter size	Classification of offspring					
					fd ♀♀	pc^{ch} ♀♀	other ♀♀	+ ♂♂	pc^{ch} ♂♂	other ♂♂
Cross 4 *fd* ♀♀ × PCT ♂♂ . .	17	48	1:1.11	4.31	51	23	0	37	48	0
Next gen. *fd* ♀♀ × PCT ♂♂.	12	27	1:1	4,66	34	20	0	19	27	0
Total	29	75	1:1	4.44	85	43	0	56	75	0

a) There were twice as many *fd* as pc^{ch} females.

b) There were more pc^{ch} than wild type males.

c) There were more pc^{ch} males than pc^{ch} females, although the overall sex ratio was normal.

d) The litter size was low (cf. 6·5 for PCT stock).

The following hypothesis was set up to explain the observed results, and evidence consistent with the hypothesis has been obtained. The original *fd* female was heterozygous for both *pink-eye* and *chinchilla* and either a reciprocal or non-reciprocal translocation between an autosome (linkage group I) and the X-chromosome such that a piece of autosome, bearing the wild type alleles of *pink-eye* and *chinchilla* was transposed to the X. In the reciprocal form this may be shown diagrammatically as $\frac{X\sim\!\!\sim\!\!\sim}{I\,\underline{\quad\quad}}\ \frac{I\,\underline{+^{p}\ +^{cch}}\sim\!\!\sim\!\!\sim X}{\sim\!\!\sim\!\!\sim X}$. Of the two unbalanced zygotes that are produced when this type of animal is crossed with a normal male, one is inviable $\left(\frac{X\sim\!\!\sim\!\!\sim}{I\,\underline{pc^{ch}}}\ \frac{\sim\!\!\sim\!\!\sim X}{\sim\!\!\sim\!\!\sim X}\right.$ deficient for a piece of autosome$\left.\right)$ while the other, bearing the transposed piece of autosome as a duplication, may survive $\left(\frac{I\,\underline{pc^{ch}}}{I\,\underline{pc^{ch}}}\ \frac{I\,\underline{+^{p}\ +^{cch}}\sim\!\!\sim\!\!\sim X}{\sim\!\!\sim\!\!\sim X}\right)$. Females of this type with two complete autosomes bearing the recessive genes are also *fd*. Two types of *fd* females are thus produced, the balanced chromosomal type, and the unbalanced chromosomal type with the autosomal duplication. The two equivalent types of male are wild type rather than flecked and a proportion of them are sterile.

Genetical Evidence for the Flecked Translocation

Genetical evidence for the *flecked* translocation was obtained by:

A. Crossing *flecked* females with *albino* males and test crossing all the types of progeny.

B. Crossing *flecked* females with *pink-eye* males.

C. Testing for linkage between the *fd*-transposition on the X and sex-linked marker genes.

A 1. Flecked females × albino males

Both the *pink-eye* and the *chinchilla* loci have been postulated to be involved in the rearrangement. Proof that this was so for the *albino/chinchilla* locus was obtained by crossing *fd* females with *albino* (*cc*) males. The *albino* males employed in this cross were from an inbred stock (JU) maintained by Dr. D. S. FALCONER of this department.

Table 2. *The cross of fd females with cc males*

No. females	No. litters	Sex-ratio at birth	Av. litter size	No. offspring classified	Classification of offspring						
					Type I *fd* (*c*) ♀♀	Type II *fd* (*cc*^{ch}) ♀♀	Type III *cc*^{ch} ♀♀	Types IV (*c*) ♀♀	Types I + II + ♂♂	Types III *cc*^{ch} ♂♂	Type IV (*c*) ♂♂
8	22	1:1.07	5.3	101	12	18	20	0	19	32	0

The results of the cross are summarised in Table 2. Two types of *fd* daughters were phenotypically distinguishable; one had white markings, while the other had markings of the *cc*^{ch} coat colour. The white flecked type could be distinguished from the *fd* mothers by the fact that the hair in the flecked areas was pure white, while that of the *fd* mothers was dark at the base as in *pc*^{ch} homozygotes. In addition patches of what appeared to be the *cc*^{ch} heterozygote coat colour could often be seen in the *fd* mothers. All the recessive type progeny, both male and female, were phenotypically *cc*^{ch} heterozygotes.

	GENOTYPE MOTHER	PHENOTYPE	GENOTYPE FATHER	PHENOTYPE
PARENTS	$\frac{pc^{ch}}{pc^{ch}}$ ++ TYPE I	*fd* (*pc*^{ch})	$\frac{+c}{+c}$ NORMAL	cc
	DAUGHTERS		SONS	
OFFSPRING	$\frac{+c}{+c}$ ++ TYPE I	*fd* (*c*)	$\frac{+c}{+c}$ ++ TYPE I	+
	$\frac{pc^{ch}}{+c}$ ++ TYPE II	*fd* (*cc*^{ch})	$\frac{pc^{ch}}{+c}$ ++ TYPE II	+
	$\frac{pc^{ch}}{+c}$ TYPE III	*cc*^{ch}	$\frac{pc^{ch}}{+c}$ TYPE III	*cc*^{ch}
	$\frac{+c}{+c}$ TYPE IV	(*c*) LETHAL	$\frac{+c}{+c}$ TYPE IV	(*c*) LETHAL
PARENTS	MOTHER $\frac{pc^{ch}}{pc^{ch}}$ ++ TYPE II	*fd*(*pc*^{ch}*c*^{ch})	FATHER $\frac{+c}{+c}$ NORMAL	cc
	DAUGHTERS		SONS	
OFFSPRING	$\frac{pc^{ch}}{+c}$ ++ TYPE II	*fd*(*cc*^{ch})	$\frac{pc^{ch}}{+c}$ ++ TYPE II	+
	$\frac{pc^{ch}}{+c}$ TYPE III	*cc*^{ch}	$\frac{pc^{ch}}{+c}$ TYPE III	*cc*^{ch}

Fig. 2. The cross of *flecked* females × *albino* males. The straight lines represent the autosomes of linkage group I and the wavy lines the x-chromosomes

Fig. 2 diagrammatically illustrates the hypothesis to explain the observed results and suggests terminology to classify the various types of animals produced. It is to be presumed that the *fd* female parents might be of two kinds as explained above. The two types are therefore shown in the upper and lower parts of the table, and it will be seen that they lead to different expected results.

The absence of any *albino* offspring from this cross indicates that Type IV animals are inviable. This fact, together with the occurrence of two phenotypic classes of *fd* females, explains the excess of *fd* over recessive type daughters.

It can be seen that a 2:1 ratio of *fd* to recessive type daughters are expected in litters of Type I mothers, but a 1:1 ratio is expected in litters of Type II mothers. It may be presumed that both types of *fd* mother were represented in the present cross. This would account for the number of *fd* daughters being in excess of the recessive type though not being twice as frequent.

In Fig. 2 both Type I and Type II males have been shown as wild type for there is no reason why, if one is wild type i.e. Type I, the other should not also be so. The expected ratio of 2:1 wild type to recessive type males is then in contrast with the observed numbers. This could be explained by reduced viability of one or both of the wild type classes, but it would not explain the excess of cc^{ch} males over cc^{ch} females, for these should occur in equal numbers. The χ^2 test of equality is 4.9 which has a probability of between 2% and 5%. The excess of cc^{ch} males was, however, not observed in later crosses and was probably due to chance despite its formal significance.

The results of this cross are compatible with the hypothesis but do not completely discriminate between the two types of *fd* female parents. Tests on the progeny of this cross were therefore carried out.

A 2. Test crosses of the progeny of fd (pc^{ch}) females

Only progeny of females which produced at least one *fd* (*c*) daughter were selected for test because such females are presumed to be of Type I and should produce offspring representing all of the different genotypes postulated.

a) fd (c) females. Eleven *fd* (*c*) females were crossed with pc^{ch} (PCT) males and four with *cc* (JU) males. The results are recorded in Table 3.

Table 3. *The cross of Type I fd (c) females with pc^{ch} males, and the cross of Type I fd (pc^{ch}) females with outbred cc males*

Phenotype of sire	No. and type of ♀♀	No. litters	Sex-ratio at birth	Av. litter size	No. offspring classified	Classification of offspring						
						Type I ♀♀	Type II ♀♀	Type III ♀♀	Type IV ♀♀	Type I and III ♂♂	Type III ♂♂	Type IV ♂♂
pc^{ch} (PCT)	12 *fd* (*c*)	34	1:1.03	4,59	123	17 (1)*	20	18	0	45	22	0
cc (JU)	4 *fd* (*c*)	14	1:0.79	5.0	39	14		9	?	9	7	?
Total	16 *fd* (*c*)	48	1:0.95	4.71	162	51 (1)*		27	?	54	29	?
cc (BC)	14 *fd* (pc^{ch})	41	1:094	5,12	187	29	35	33	0	55	35	0

* One exceptional female was wild type in phenotype.

The following points about the results of this cross are important: A good 2:1 ratio of *fd* to recessive type females was obtained, and again phenotypically distinguishable *fd* females were produced. There was an excess of wild type over recessive type males, and this may be attributable to the fact that in this cross all the mothers were of Type I. Some of the wild type males were noticeably

small in size and they frequently did not survive to weaning. This suggests that one of the two theoretical classes of wild type males is relatively inviable. No pc^{ch} or cc, but only cc^{ch} recessive type offspring were produced when pc^{ch} males were employed. This indicates that none of the *fd* (*c*) mothers were heterozygous for *pink-eye* or *chinchilla*. The litter size was low and this provides supporting evidence for the occurrence of inviable classes. All these points are in accord with the hypothesis that the *fd* (*c*) mothers are of Type I.

Table 3 also shows the results of the equivalent cross in the following generation. Type I *fd* (pc^{ch}) females were crossed with *cc* males from an outbred stock (BC), maintained by the author, in order to try and increase the fertility of the *flecked* stock. The data were in close agreement with those of the previous generation, but although the litter size was somewhat larger, the proportion of wild type males decreased slightly. One exceptional female was produced in this type of cross and this will be discussed later.

b) fd (cc^{ch}) *females.* The *fd* (cc^{ch}) females were crossed with either pc^{ch} or *cc* males. It was found more convenient to use *cc* males, for some *fd* ($c^{ch}c^{ch}$) were produced when pc^{ch} males were employed, and these were difficult to classify on certain backgrounds.

Table 4 records the results of this type of mating. The important points in these results are: *fd* and recessive type females appeared in equal numbers, and

Table 4. *The cross of Type II fd* (cc^{ch}) *females with either* pc^{ch} *or cc males*

No. females	No. litters	Sex-ratio at birth	Av. litter size	No. offspring classified	Classification of offspring			
					Type II ♀♀	Type III ♀♀	Type II ♂♂	Type III ♂♂
23	54	1:0.76	5.81	274	74	85	23	92

two phenotypically distinguishable classes of both *fd* females and recessive type males and females were obtained by segregation of the *albino* and *chinchilla* alleles in the heterozygous mothers. There was an extreme shortage of wild type males when classification was done at three weeks of age. The examination of litters at an earlier age showed that these males were present in higher numbers at birth, but they did not grow as fast as their sibs and many died before they reached weaning age. The litter size was larger than that of the *fd* (*c*) females, indicating that no lethal class was produced.

These points are in accord with the hypothesis that the *fd* (cc^{ch}) females are of Type II and are heterozygous for the *albino* and *chinchilla* alleles carried on the two complete autosomes. It is apparent that the Type II males, which are the only type of wild type male produced by Type II females (see Fig. 2), are a relatively inviable class, and this explains the shortage of wild type males from the expected numbers in the previous crosses.

An important point about all the results presented so far is that not one crossover between either the *pink-eye* or the *chinchilla* locus and the break point has yet been detected.

c) Recessive type females and males. 15 cc^{ch} females and 21 cc^{ch} males were crossed with pc^{ch} or *cc* animals. The results are presented in Table 5. At least

20 offspring were scored from each cross, and all were of the two recessive types expected if the parents possessed the normal chromosome complement and were heterozygous for *albino* and *chinchilla*. These animals therefore represent Type III of Fig. 2.

Table 5. *The cross of Type III cc^{ch} females and males with either pc^{ch} or cc animals*

Sex tested	No. tested	No. offspring classified	Av. litter size	Sex-ratio at birth
female . .	15	223	7,2	1:1.01
male . .	21	323	7.3	1:1.26

d) Wild type males. The wild type sons of both Type I and Type II females were tested. Fig. 3 diagrammatically illustrates the expected results of the crosses of the two types of wild type males with *cc* females. It can be seen that litters of Type I males can be distinguished from those of Type II males by the fact that Type I males produce one inviable class of son. The effect

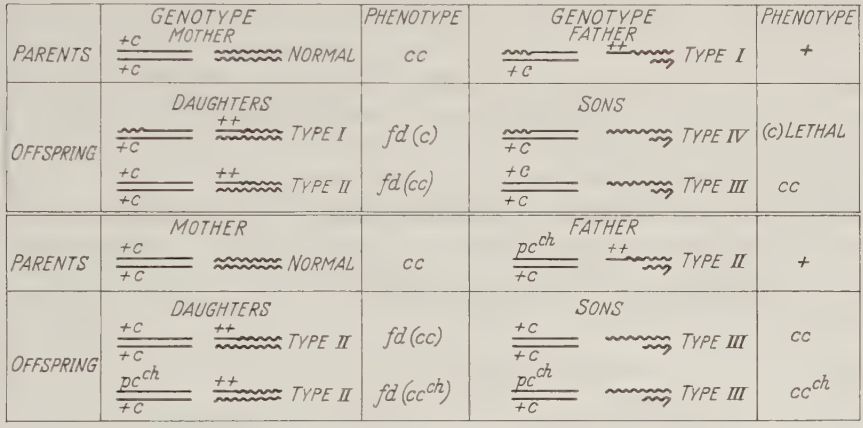


Fig. 3. The cross of *flecked*-bearing wild type males × *albino* females. The straight lines represent the autosomes and the wavy lines the sex-chromosomes

can be seen in three ways: Type I males produce only one phenotypic class of male offspring, the sex-ratio is abnormal, and the litter size is reduced.

The results of the crosses are presented in Table 6: they are in agreement with the hypothesis set out in Fig. 3. Type I males could be distinguished from

Table 6. *The cross of Type I and Type II males with cc females*

Genotype of males	No. litters	No. offspring born	Sex-ratio at birth	Av. litter size	No. offspring classified	Classification of offspring				
						fd ♀♀	♀♀ recessive	♂♂ recessive	*fd* ♂♂	Others
Type I	79	379	1:0.66	4.8	357	214	4	137	1	1 ♀
Type II	121	901	1:1.29	7.45	825	350	2	472	1	0

Type II males by the classification of their litters for litter size and sex-ratio, and also by the fact that they produced only one phenotypic class of son. Type I daughters of Type I males could also be distinguished by breeding tests.

Since the two types of wild type male could be distinguished by genetical tests, it was possible to show that Type II females produce only Type II sons.

while Type I females may produce both types of wild type sons. Data to illustrate this fact is presented in Table 7.

A point of note is that although the wild type sons of Type I females were taken at random for testing, Type II males were only one third as frequent as Type I males. Also, the Type I females produced a number of completely sterile sons. This class of male possibly belongs to Type I and represents a more extreme case of reduced fertility, for no sterile sons were produced by Type II females. In support of this conclusion is the fact that many Type I males become sterile after producing only one or two litters. It would thus appear that the fertility of this class of male is very variable, and there is a tendency for complete sterility to occur.

Table 7. *The classification of the wild type sons of Type I and Type II females*

Type of Mothers	No. Wild type sons tested	Classification of sons		
		Type I	Type II	Sterile
I	36	22	7	7
II	22	0	22	0

The results in Table 7 therefore indicate that only about 25% of Type II males are viable. This is in agreement with the estimate of viability based on the ratio of wild type to recessive type males in the litters from which the test animals were selected. It is also in agreement with the estimate of viability of Type II males in litters of Type II females (see Table 4).

In order to illustrate the small size of the Type II males at three weeks of age, the individuals of some litters of both Type I and Type II females were weighed. The average weights of the different types of offspring are shown in Table 8. It can be seen that the average weight of Type II sons of Type II mothers was

Table 8. *The average weights of offspring of crosses of Type I and Type II females with cc (BC) males*

Type of Mother	Type I ♀♀		Type II ♀♀		Type III ♀♀		Wild Type ♂♂		Type III	
	No.	Av. wt. gms	No.	av. Wt. gms	No.	Av. Wt. gms	No.	Av. Wt. gms	No.	Av. Wt. gms
I	26	8.3	22	8.4	23	8.9	42	8.7	29	9.9
II	-	—	42	7.9	43	9.8	13	5.3	42	9.7

appreciably lower than that of their sibs. It is apparent, however, that although small Type II males were produced by Type I mothers, the proportion that survived to three weeks of age was not large enough to lower appreciably the mean weight of the compound wild type class. There was an overlap of the weights of the "small" and "normal" wild type males, and the two could only be distinguished within litters.

With only nine exceptions all the female progeny of both types of males were *fd* and all the sons were recessive types. The close linkage of the *fd*-transposition with the X-chromosome is good evidence for the theory that the X is involved in the translocation. The occurrence of the nine exceptional animals will be discussed later.

B. Flecked females × pink-eye males

The *pink-eye* as well as the *chinchilla* locus has been postulated to be involved in the rearrangement. This is indicated in *fd* (pc^{ch}) females where the *flecked*

markings are the white colour of the pc^{ch} compound homozygote. The absence of crossing over between the two loci in *fd* animals provides additional evidence. Final proof that the *pink-eye* locus is involved in the translocation was obtained by the cross of *fd* females with *pp* males.

The *pp* males employed were from the RF stock maintained by Mrs. Clayton of this department. The stock had the *pink-eye* gene on an otherwise wild type CBA background. The *fd* females used were obtained from the early crosses of *fd* females with pc^{ch} males (see Table 1), and could have been either of Type I or Type II.

Table 9. *The cross of females flecked for both pink-eye and chinchilla with pp males*

No. females	Classification of offspring			
	fd (*p*) and/or *fd* (*pp*) ♀♀	*pp* ♀♀	+ ♂♂	*pp* ♂♂
6	20	18	16	18

Table 9 presents the results of crossing six *fd* females with *pp* males. A new type of *fd* female was produced for the *flecked* markings were of the *pink-eye* coat colour. All the recessive animals were of the *pink-eye* phenotype. The *pink-eye* locus must therefore be affected by the rearrangement.

An interesting feature about the *fd* (*p*) animals was that on the average the *flecked* markings were smaller than those of the *fd* (*c*) or *fd* (cc^{ch}) animals.

C. Tests for linkage between the fd-transposition and sex-linked genes

The cross of *fd*-bearing males with *cc* females has provided evidence that the *fd*-transposition is attached to the X-chromosome. It was considered that tests for the linkage of *fd* with sex-linked marker genes would provide conclusive proof that the X-chromosome is involved in the translocation, and would localise the *fd*-transposition on the X-chromosome.

The two sex-linked genes *Tabby*, (*Ta*) and *Bent-tail* (*Bn*), were selected; these are separated by a distance of 11 crossover units (Falconer 1954). The

Table 10. *The linkage of fd and Ta*

Non-crossovers		Crossovers		Crossing over %
Phenotype	No.	Phenotype	No.	
fd ♀♀	138	*Ta*/+; *fd* ♀♀	2?	1.43?
Ta/+; recessive type ♀♀	147	recessive type ♀♀	?	—
+ ♂♂	61	*Ta* ♂♂	3	4.69
Ta; recessive type ♂♂	140	recessive type ♂♂	5	3.45

results of the linkage tests of *fd* and *Ta* are shown in Table 10. The method employed was to cross *fd* females with *Ta*; *cc* or *Ta*; cc^{ch} males to obtain *Ta*/+; *fd* daughters. These were then crossed with *cc* males and the progeny were scored for crossovers. In practice it was found that only three of the four classes of offspring could be classified, for the *Ta*/+ phenotype could not always be distinguished on the *albino* background. In addition some difficulty was encountered in classifying *fd* females with extreme *flecked* markings for the *Ta*/+ phenotype. This meant that only the males could be accurately scored for crossovers. The

results show that *fd* and *Ta* are closely linked, the crossover frequency being approximately 4%.

Data for the linkage of *fd* and *Bn* have not yet been obtained, but a few preliminary crosses of *fd* females with *Bn* males were made to see if any hemizygous *Bn* females could be produced. This would indicate that the translocation was reciprocal in nature, and that Type II animals were deficient for the piece of the X-chromosome bearing the *Bn* locus. No such hemizygous *Bn* females were produced but unfortunately it was not possible in this cross to distinguish phenotypically those females which possessed the *fd*-transposition. It is unlikely, however, that the *Bn* locus is involved in the translocation.

Cytological Evidence for the Translocation

Genetical evidence for the presence of an X-autosome translocation in the *flecked* stock has been obtained by the progeny tests on *fd*-bearing males, and by the linkage of *fd* with *Ta*, as explained in the previous sections. Cytological confirmation of the translocation was therefore sought as follows. Males bearing the *fd*-transposition were tested by the method described by SLIZYNSKI (AUERBACH and SLIZYNSKI 1956; FALCONER, SLIZYNSKI and AUERBACH 1942). The examination of meiotic I metaphase plates of both Type I and Type II males did not reveal any evidence for the presence of a translocation. No ring-of-four structures were seen and 20 bivalents were regularly counted. The analysis of pachytene chromosomes by Dr. SLIZYNSKI has, however, provided cytological evidence for the attachment of a piece of autosome to the end of the X distal to that which associates with the Y. Both genetical and cytological evidence thus indicate that a piece of autosome has been transposed to the X.

Sterile wild type males produced by Type I females were also examined cytologically. Spermatozoa were produced, but the sperm heads showed gross structural, abnormalities. This was probably the cause of the observed sterility.

Intercrosses of *fd* Females and *fd*-Bearing Males

An attempt was made to obtain females that were homozygous for the X bearing *fd*-transposition. Type II females were therefore crossed with Type I and Type II males.

Fifty-six offspring were obtained from the intercross of Type II animals. Of these 25 were *fd* females, 8 were wild type males, and 23 were recessive type males. All appeared perfectly normal. 22 of the *fd* females were crossed with *cc* males, and all produced *fd* and recessive type daughters and wild type and recessive type sons. The appearance of the recessive types indicates that the *fd* mothers possessed a normal X-chromosome, and therefore were not homozygous for the transposition.

The results suggest that females, homozygous for the transposition and with two normal autosomes, are inviable. Evidence in support of this conclusion is the low average litter size of the intercross mating (3.3), and the excess of males, in spite of the fact that the wild type males are of Type II and thus only 25% viable.

The cross of Type II females with Type I males has to date only yielded one litter as a consequence of sterility problems with the Type I males. The mother of this litter was genotypically *fd* (*cc*) and the father was heterozygous for *pink-eye* and *chinchilla*. The litter contained one exceptional female that was phenotypically wild type, one *fd* (*c*) female, one *fd* (cc^{ch}) female, and two wild type males. It is conceivable that the exceptional female is homozygous for the transposition, and this may also apply to the *fd* (*c*) female for it showed only slight *flecked* markings.

Both females have been crossed with *cc* males. The exceptional female produced 15 *fd* daughters and 15 wild type sons; the *fd* (*c*) female produced 3 *fd* daughters and 2 wild type sons. All the daughters were flecked for the albino coat colour so it is likely that both females were of Type I. The absence of any recessive type progeny provides supporting evidence that the two females are homozygous for the transposition. It may therefore be that only Type I females homozygous for the transposition are viable, while the Type II homozygotes are inviable[1].

Exceptional Animals

The cross of *fd*-bearing males with *cc* females normally produces only *fd* daughters and recessive type sons. Nine exceptional animals appeared in crosses of this type. Six of the exceptional animals were recessive type females and two were phenotypically *fd* males. The occurrence of these classes of exceptional animals has already been reported (Cattanach 1960). It was shown that the recessive types were matroclinous XO females for they did not possess their fathers' *fd*-bearing X-chromosomes, and the males were XXY in chromosomal constitution having inherited the *fd*-bearing X- and Y-chromosomes from their fathers. The occurrence of the *fd* males has been attributed to non-disjunction of the X- and Y-chromosomes in the meiotic divisions of their *fd*-bearing fathers. This explanation could also account for the appearance of the recessive type females; alternatively the loss of the Y- or *fd*-bearing X-chromosomes could have occurred shortly after fertilisation (see Russell and Saylors 1960).

The ninth exceptional animal produced by a *fd*-bearing male was a phenotypically wild type female. Its phenotype could be explained in two ways: It could possess one autosome bearing the wild type alleles of *pink-eye* and *chinchilla* as a result of a crossover between the *fd*-transposition and the complete autosome, i. e. $\frac{+^{p}\ +^{ch}}{+^{p}\ c}$ $\sim\!\sim\!\sim$ $p^{c}ch$. Alternatively, this exceptional animal could be a patroclinous XO female, for Russell and Bangham (1960) have shown that the variegation caused by one of their position effects is not expressed in XO females. The present exceptional animal may therefore have arisen as a consequence of non-disjunction in the gametogenesis of the mother, or shortly after fertilisation, or it could have occurred as a result of the mother herself being an XO female that

[1] Several wild type females have now been produced in the cross of Type II females with Type I males and are in the process of being tested genetically. The results to date indicate that they are homozygous for the *fd*-transposition while their *fd* sibs all appear to be heterozygous for the transposition. It can therefore be concluded that the *fd* phenotype is not expressed in females in which both X-chromosomes carry the transposition.

had arisen spontaneously. Chromosome counts of the mother have been carried out, using the method of FECHHEIMER (1960) for corneal epithelial tissue, and 40 chromosomes were regularly counted. The mother was not therefore an XO female. Genetical tests on the exceptional female are now in progress, and one litter has been produced so far in a cross with a *Ta; cc* male. The litter consisted of three females of which two were *Ta/+; fd* and one was phenotypically *Ta/O; cc*[1]. It is therefore most likely that the exceptional animal represents a further example of primary non-disjunction and is a patroclinous XO female.

One other exceptional female appeared in the cross of a Type I *fd(c)* female with a pc^{ch} male. This female also was phenotypically wild type. Its occurrence could again be explained either by a crossover between *fd*-transposition and the complete autosome, or by primary nondisjunction, this time involving the loss of the paternal sex-chromosome. Breeding tests yielded no useful information for only one litter was produced and this was eaten at birth. However, mitotic chromosome counts on coded slides indicated that the female possessed only 39 chromosomes. The most likely hypothesis for the occurrence of the exceptional animal is, therefore, that it was a matroclinous XO female. It would seem therefore that the *flecked* position effect is analogous to that described by RUSSELL and BANGHAM (1960) in so far as variegation is not expressed in XO females.

An attempt was made to demonstrate that XO females with the *fd*-transposition are wild type by making a cross that should produce this type of female. A Type I male was crossed with *Ta/O; cc* females. To date only one litter of two females has been produced. One female was wild type in phenotype and may be an XO female with the father's X-chromosome bearing the *fd*-transposition[2]; the other female was of an unexpected phenotype for it was *Ta/O; cc* rather than *fd* or wild type. The only explanation to account for the appearance of this animal is that it must be a matroclinous XO female, caused by a further incidence of non-disjunction. Both females are being further investigated.

Discussion

Evidence is presented to show that a mosaic coat colour in the mouse, denoted flecked (*fd*), represents an example of the phenomenon of variegated-type position effect. The *flecked* phenotype is caused by a translocation between an autosome (linkage group I) and the X-chromosome. In this respect *flecked* is analogous with the two position effects described by RUSSELL and BANGHAM (1959, 1960), and the three cases indicate that the X-chromosome is particularly effective in producing this type of phenomenon.

[1] Mitotic chromosome counts have now been carried out on the *Ta/O; cc* daughter of the presumed patroclinous XO female and 39 chromosomes were regularly counted on coded slides. It seems safe to conclude that it possessed an XO chromosome constitution and this, together with the genetical evidence, indicates that the mother is a patroclinous XO female which owes her origin to primary non-disjunction either in the gametogenesis of the mother or in the fertilized egg.

[2] The wild type female produced in the cross of a *Ta/O; cc* female with a Type I male has now been shown to have an XO chromosome constitution and to carry the *fd*-transposition on its single X-chromosome. This provides supporting evidence for the hypothesis that a normal as well as a *fd*-bearing X-chromosome are required for the expression of the flecked phenotype.

In the present case the rearrangement involves the transposition of a piece of autosome, bearing the wild type alleles of the linked genes *pink-eye* (*p*) and *chinchilla* (c^{ch}), to the X-chromosome. Females possessing the translocation and which are heterozygous for either, or both, of the recessive genes exhibit the variegated phenotype. Males that possess the same chromosomal constitution are wild type. This type of animal is referred to as Type I.

When Type I animals are crossed with normal animals four types of zygote are produced, and two of these have unbalanced chromosomal constitutions. One of the chromosomally unbalanced types is deficient for a piece of autosome and is inviable. The other possesses two complete autosomes and carries the piece of autosome transposed to the X as a duplication. Females of this class are viable, and when both their autosomes bear the recessive genes they are *flecked* in phenotype. Males of this class are only partially viable and are wild type.

Both genetical and cytological evidence in favour of these conclusions have been obtained. The complete inviability of one of the zygotic types is indicated by the absence of one phenotypic class of offspring in litters of Type I animals and the associated low litter size. The viability of Type II females, and hence the occurrence of two genotypic classes of *fd* daughters in litters of Type I females, is indicated by the observation that two phenotypic classes are distinguishable in suitable crosses, and by the fact twice as many *fd* females as recessive females are produced. Proof that two types of *fd* females occur was obtained by breeding tests. Litters of Type II females differ from those of Type I by the production of *fd* and recessive type daughters in equal numbers, an extreme shortage of wild type sons all of which can be shown to be of Type II, and by larger litter sizes.

Evidence for two types of wild type males in litters of Type I mothers is more difficult to obtain for the two classes cannot be accurately distinguished phenotypically, and the ratio of wild type to recessive type males is usually short of a 2:1 ratio.

The occurrence of two types of wild type males is, however, indicated phenotypically by the size difference within this class in litters of Type I females, but proof that two types of males occur was obtained by breeding tests. Type I males possess the complete translocation and consequently half their sons obtain the deficient autosome and are inviable. Litters of Type I males therefore differ from those of Type II by the absence of one phenotypic class of son, an abnormal sex-ratio, and by low litter sizes.

The deviation from a 2:1 ratio of wild type to recessive males is a consequence of the reduced viability of Type II males. Evidence for the poor viability of Type II males is clearly demonstrated in litters of Type II females, since these produce only one class of wild type son, i. e. Type II. These should be produced in equal numbers with the recessive type males, but they are markedly deficient at three weeks of age. Small size and a tendency to die at an early age are characteristic features of Type II males for only 25—30% survive to three weeks of age. Compatible with this observation is the fact that the average litter size of Type II females is lower than that of their normal sibs (cf. Tables 4 and 5), and this may indicate that some Type II males die prenatally.

Breeding tests on the progeny of Type I females also indicate the reduced viability of Type II males. Type I females should produce Type I and Type II

sons in equal numbers, but genetical tests on all the wild type sons produced by this class of female is a given period proved that most are of Type I. A proportion of these sons were sterile, and as no sterile sons of Type II females have yet been found, it was concluded that they represented a more extreme example of the reduced fertility of Type I males. If the sterile males are included as being of Type I, then four times as many Type I as Type II males are represented at maturity. This again indicates that only about 25% of Type II males are viable.

There is one discrepancy concerning the viability of Type II males. The observed ratio of wild type to recessive type males in the total litters of all Type I females is closer to a 2:1 ratio than would be expected if only 25% of the Type II males survive. However, a greater proportion of Type II males may survive with supplementary feeding, and there is some evidence that fewer survive in larger litters (cf. generations in Table 3). If this is so, then it would be expected that a greater proportion would survive in litters of Type I females which produce somewhat smaller litters than Type II females (cf. Tables 3 and 4).

The reduced viability of Type II males may mean that the original translocation was of a reciprocal type. Proof that a piece of autosome was transposed to the X-chromosome is provided by the transmission of the *flecked* character from father to daughter, and by the linkage of *fd* with the sex-linked gene, *Ta*. There is no such direct evidence that a piece of X was reciprocally exchanged in the translocation and attached to the autosome, but the difference in viability between Type I and Type II males may indicate that this was the case. If Type I males possess both reciprocally rearranged chromosomes and thus possess the full chromosome complement, then they would be expected to be fully viable, which they are. Type II males, on the other hand, would then be deficient for a piece of the X-chromosome and their loss of viability would be expected, since it is known that the OY chromosome constitution is inviable (WELSHONS and RUSSELL 1959). It is most likely therefore that a piece of the X-chromosome was rearranged when the original translocation was induced and was probably reciprocally exchanged with the *fd*-transposition.

Several observations indicate that the rearrangement involves only small pieces of the chromosomes. The viability of one of the two unbalanced chromosome types indicates that the autosomal duplication does not produce noticeable deleterious effects and, as has already been discussed, a deficiency for a piece of X could not be very large or it would cause lethality in the male. In addition no sign of an association of four could be seen in the cytological preparations. This suggests that the transposition is too small to create pairing difficulties between the rearranged chromosomes and their homologues.

The present example of the V-type position effect closely resembles those of RUSSELL and BANGHAM (1959, 1960) but it differs in several features. They are similar in that an X-autosome translocation is the cause of each of them, but a most important feature which distinguishes the inheritance of *flecked* is the survival of one of the unbalanced chromosome types. Another distinguishing factor of *flecked* is the fertility of most of the males that are heterozygous for the translocation. The sterility that occurs in some is not a consequence of a breakdown of meiosis at pachytene as occurs in RUSSELL and BANGHAM's mice but is due to abnormal sperm production. If the meiotic breakdown in RUSSELL and

Bangham's mice is caused by pairing difficulties, then the fertility of *fd*-bearing males may again indicate the small size of the *fd* transposition.

A further factor which distinguishes the *flecked* position effect is that crossing over does not appear to occur between the marker genes and the break point on the transposition, and the complete autosome. This is especially interesting in view of the fact that the position effect concerns two genes, *pink-eye* and *chinchilla*. The loci of these genes are 14 crossover units apart (Green and Dickie 1960), but no crossing over was observed to occur between either gene and the break point. The absence of crossing over in *fd*-bearing mice could be explained in two ways. It is possible that the break is close to one of the genes and the rearrangement suppresses crossing over between the two genes. A more likely alternative is that crossing over is prevented by an absence of pairing between the normal autosome and the transposition as the cytological data suggests. In either case it would seem thet the crossover distance of 14 units represents only a small length of actual chromosome.

It has been observed that *fd* (pc^{ch}) animals occasionally show two variegated coat colours for, in addition to the white markings of the combined pc^{ch} genes, markings resembling the colour of the cc^{ch} heterozygotes have been found. This occurrence could be explained in two ways. If the *pink-eye* allele is transferred to the complete autosome by somatic crossing over, variegation for only the *chinchilla* gene could take place. It is unlikely that this hypothesis is correct, however, since meiotic crossing over does not appear to occur. An alternative hypothesis is that a spreading effect is operative. The phenomenon of the spreading effect has frequently been observed in *Drosophila* where it has been found that the effect exerted by heterochromatin on genes on a newly adjoining euchromatic region of chromosome spreads along the chromosome from the break point always affecting first the gene closest to the break point. Thus variegation for the gene nearest to the break point may often be seen independently of that of the neighbouring genes.

In *fd* (pc^{ch}) animals, the colour of the additional variegated markings was very similar to the coat colour of cc^{ch} heterozygotes. This suggests that the c^{ch}/O is phenotypically like cc^{ch} and that the *albino* locus is nearer to the break point than the *pink-eye* locus. The observation that on the average the variegated markings of *fd* (*p*) animals are smaller than those of *fd* (*c*) animals is in agreement with this conclusion. The break point and the *pink-eye* locus thus seem to lie on opposite sides of the *albino* locus. It may be added that the same conclusion would be reached on the hypothesis that somatic crossing over is the cause of the cc^{ch} variegation in *fd* (pc^{ch}) females.

While the spreading effect indicates an analogy between the V-type position effects in *Drosophila* and the mouse, there is at least one difference. In *Drosophila*, these position effects are expressed in both sexes, although the Y-chromosome tends to suppress variegation (see review by Lewis 1950). In the mouse, however, variegation is normally only expressed in the female. This could be attributed to a suppression of variegation by the Y-chromosome, or to the presence of only one X in the male. The data presented here, together with those of Russell and Bangham (1960) and Cattanach (1960), indicate that the number

of X-chromosomes is the decisive factor. Thus XO females and XY males possessing the transposition are wild type, and XX females and XXY males with one X bearing the transposition are variegated. This difference between *Drosophila* and the mouse may be correlated with the difference in the sex-determining systems in the two animals.

A further difference between the position effects in the mouse and *Drosophila* will emerge if the wild type female or the slightly *flecked* female produced by the cross of a Type II female with a Type I male are proved to be homozygous for the *fd*-transposition[1]. In *Drosophila*, homozygotes for rearrangements that cause V-type position effects tend to show more variegation. It has been suggested that this may possibly be due to the closer association of heterochromatin with the affected pair of alleles in the homozygotes since pairing of the homologous segments of the rearranged chromosomes may be easier (LEWIS 1950). If female mice homozygous for the *fd*-transposition should be non-variegated or show reduced variegation, this could be explained on the hypothesis that it is unlikely that both rearranged genes in the homozygote will be affected in any one cell. On the other hand, it is perhaps of some significance that many of the sex-linked genes in the mouse produce mottled phenotypes, and that the mottling is only produced when the genes are in the heterozygous condition. In this respect the V-type position effects in the mouse closely resemble the sex-linked genes.

The mottled phenotypes caused by V-type position effects and sex-linked genes in the mouse possibly indicate that the function of genes associated with the X-chromosome are modified by the proximity of the heterochromatin of the X. An alternative explanation for the tendency of sex-linked genes in the mouse to give mottled phenotypes has recently been put forward by LYON (1960). She postulates that it is the usual and normal thing in the somatic cells of the female mouse for one X-chromosome to be inactivated. In a female heterozygous for a mutant gene some cells would have the mutant gene active and others the normal, and this would result in a mottled phenotype. On this hypothesis cells in which the *fd*-bearing X is active will give rise to the wild type coat colour, and those in which the normal X is active, the recessive type coat colour. In this manner LYON's hypothesis explains why XX females and XXY males with only one X-chromosome bearing the *fd*-transposition are *fd*, while XO and XX females and XY males whose X's bear the transposition are wild type. With this explanation, the variegated phenotypes caused by X-autosome translocations in mice are not analogous to the V-Type position effects of *Drosophila*. However, if the operation of a spreading effect correctly explains the occurrence of the two variegated colours in *fd* (pc^{ch}) animals, then LYON's hypothesis does not hold and the two phenomena are probably analogous.

The cytological evidence has indicated that the piece of autosome transposed to the X is attached to the end of the X opposite to that which associates with the Y. Linkage tests are now being carried out with *fd* and sex-linked marker genes. Once *fd* has been localised with respect to these genes, it should then be possible to localise on the linkage map the end of the X that associates with the Y.

[1] See Footnote 1, p. 175.

The linkage of the *fd*-transposition with the X-chromosome has allowed the classification of non-disjunction products among the offspring of *fd*-bearing males, and nine exceptional animals have been produced. The occurrence of phenotypically flecked males and recessive type females has already been reported, and has been attributed to non-disjunction of the X- and Y-chromosomes in the fathers, at least in the cases of the males (Cattanach 1960). The single wild type female which appeared in the same type of cross could not have arisen by non-disjunction in the father for it possessed its father's *fd*-bearing X-chromosome. Although mitotic chromosome counts have not yet been carried out, all the genetical evidence indicates that it represents an example of primary non-disjunction and is a patroclinous XO female[1]. This type of XO female has been induced by irradiation shortly after fertilisation (Russell and Saylor 1960), and the occurrence of three exceptional females has been explained on the hypothesis that they possess only the paternal X-chromosome (McLaren 1960, Cattanach 1960). The present example, however, probably represents the first substantiated example of a spontaneously occurring patroclinous XO female.

Summary

Evidence is presented to show that a chemically induced variegated coat colour mutation in the mouse, denoted *flecked* (*fd*), is caused by a translocation between an autosome and an X-chromosome and represents an example of a V-type position effect. Two autosomal genes, *pink-eye* and *chinchilla*, are affected by the rearrangement.

The expression of *fd* is normally limited to females, but studies of the character in XO females and XXY males have shown that the determining factor is the number of X-chromosomes.

Two types of *fd* females occur: one has the complete translocation, and the other has an unbalanced chromosome complement possessing the transposed piece of autosome as a duplication. Both appear to be fully viable. Two equivalent types of *fd*-bearing males also occur: the balanced type is fully viable but tends to be sterile, the unbalanced type is fully fertile but only about 25% are viable.

The loci of the two affected genes are 14 crossover units apart but crossing-over between them is suppressed. Cytological studies on *fd*-bearing males have indicated that this may be due to a lack of pairing between the transposition and the complete autosome. Observations are described suggesting the operation of a spreading effect, which would indicate that the *chinchilla* locus is nearer to the break point than the *pink-eye* locus.

Several exceptional animals showing unexpected phenotypes appeared in the *fd* stock. Most of these have been shown to be aneuploid for the sex-chromosomes and to have arisen by non-disjunction.

The position effect has been compared with those of Russell and Bangham (1959, 1960) in the mouse, and also with those described in *Drosophila* (Lewis 1950).

Acknowledgements. My grateful thanks to Dr. C. Auerbach, F. R. S. for her most helpful advice and encouragement throughout the course of the work, and to Dr. B. M. Slizynski for his help with the cytological aspects of the problem. I would also like to thank Dr. D. S. Falconer for reading the manuscript and Dr. N. S. Fechheimer for demonstrating his technique for counting chromosomes.

[1] See Footnote 1, p. 176.

References

Auerbach, C., and B. M. Slizynski: Sensitivity of the mouse testis to the mutagenic action of X-rays. Nature (Lond.) **177**, 376 (1956).

Carter, T. C., M. F. Lyon and R. J. S. Phillips: Induction of mutations in mice by chronic gamma irradiation; interim report. Brit. J. Radiol. **29**, 106 (1956).

Cattanach, B. M.: XXY mice. Genetic. res. **2**, 156 (1961).

Falconer, D. S.: Linkage in the mouse: The sex-linked genes and "*rough*". Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **86**, 263 (1954).

— B. M. Slizynski and C. Auerbach: Genetical effects of nitrogen mustard in the house mouse. J. Genet. **51**, 81 (1952).

Fechheimer, N. S.: Mammalian cell chromosome counts. A simple method for making preparations. Nature (Lond.) **188**, 247 (1960).

Green, M. C., and M. M. Dickie: Linkage map of the mouse. J. Hered. **50**, 3 (1959).

Lewis, E. B.: The phenomenon of position effect. In: Advances in Genetics III, edit. by M. Demerec, p. 73. New York: Academic Press Inc. 1950.

Lyon, M. F.: Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.). Nature (Lond.) **190**, 372 (1961).

McClintock, B.: Controlling elements and the gene. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **16**, 197 (1956).

Russell, L. B., and J. W. Bangham: Variegated-type position effects in the mouse. Genetics **44**, 532 (1959).

— — Further analysis of variegated-type position effects from X-autosome translocations in the mouse. Genetics **45**, 1008 (1960).

— and C. L. Saylor: Factors causing a high frequency of mice having the XO sex-chromosome constitution. Science **131**, 1321 (1960).

Russell, W. L.: X-ray induced mutations in mice. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **16**, 327 (1951).

— Mammalian radiation genetics. Symposium on Radiobiology, edit. by J. J. Nickson, p. 427. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1952.

— Comparison of X-ray induced mutation rates in *Drosophila* and mice. Amer. Nat. **90**, 69 (1956).

Sturtevant, A. H.: The effects of unequal crossing over at the bar locus in *Drosophila*. Genetics **10**, 117 (1925).

Welshons, W. J., and L. B. Russell: The Y-chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **45**, 560 (1959).

Dr. Bruce M. Cattanach,
M.R.C. Induced Mutagenesis Group, Institute of Animal Genetics,
University of Edinburgh, Edinburgh (Scotland)

Zeitschrift für Vererbungslehre 92, 183—189 (1961)

Division of Molecular Biology Vanderbilt University Nashville, Tennessee

ON THE NATURE OF HNO_2 AND UV DAMAGES IN T-EVEN BACTERIOPHAGES *

By

Nils Aall Barricelli and Kirk Avent

With 2 Figures in the Text

(Received May 4, 1961)

Introduction

In a recent paper Harm (1960) has presented the results of a comparative investigation of HNO_2-inactivation and UV-inactivation of phage T4. His conclusion is that the differences in behaviour of T4 phages after HNO_2-inactivation and UV-inactivation can be explained assuming that about $^1/_6$ of the HNO_2-inactivation events imply" injection damages" while the remaining $^5/_6$ are damages of roughly the same type which are caused by UV. The term "injection damage" is here used to designate any damage which by blocking an early stage of infection or by other means prevents the participation of the phage and any part of its genetic material in reactivation and crossing phenomena of any kind. By this definition the effect of injection damage in multiplicity reactivation (MR) would be equivalent to a reduction of the multiplicity of infection which can be calculated simply by excluding those phages which have received injection damages (Harm 1960).

An alternative interpretation one may propose for the HNO_2 data holds that damages caused by HNO_2 in T4 have an average length equal to 12% of the genome (0.12 TU) which is more than 30 times larger than UV damages in the same phage. This alternative interpretation shall in this paper be designated "finite damage theory" as opposed to Harm's "injection damage theory". Both interpretations will be investigated and whatever information the HNO_2 data can give about the size of the involved parameters will be presented.

An experimental way to decide between the two interpretations will be indicated in the conclusion.

For UV damages it will be shown that the injection damage theory is not an adequate explanation.

Crossreactivation (CR) after HNO_2 Treatment

CR-experiments with a single marker give no possibility of distinguishing between the "finite damage" and the "injection damage" theories. Both theories lead, with a minor difference of parameter interpretation, to the same formula for marker survival. The only difference is that the probability e^{-L_0gh} of not hitting directly the marker with a genetic damage according to the first theory

* This investigation was supported by research grant RG-6980 from the Division of General Medical Sciences and C-4437 from the National Cancer Institute of the National Institutes of Health, U.S.A. Public Health Service.

(L_0 = mean length of a genetic damage produced by a single hit on the marker, h = no. of lethal hits per phage, g = fraction of genetic damages among the total number of damages produced) is replaced by the probability e^{-Jh} of not producing an injection damage in the phage according to the second theory (J = fraction of injection damages among the total number of damages produced). Moreover the above exponential expression is the only one which contains L_0 or alternatively J in the marker survival formula (Barricelli and Doermann 1961). Apart from this difference, the marker survival formula is the same in the two theories.

It is clear from the above considerations that any CR estimate of J on the basis of the injection damage theory will automatically yield an estimate of $L_0 g$ if the finite damage theory is used as a basis. For example an injection damage interpretation of CR in UV-irradiated phages would imply $J = 0.003$ for UV damages, since this is the value found for $L_0 g$ (Barricelli and Doermann 1961). This J value is used in the injection damage interpretation of MR data (see Fig. 2).

Unfortunately the complete formula for marker-survival contains several parameters, and L_0 (or J) is not the only one which can be expected to change with the source of radiation or inactivation agent. With the present CR data for HNO_2-inactivated phage, which are limited to doses below 30 hits, it does not seem possible to obtain a reliable estimate of J or L_0. The method (Harm 1960) of comparing reactivation data after HNO_2 treatment with reactivation data after UV irradiation will not be relied on here for the following reasons: The observed survival frequencies after UV treatment in multiplicity reacitvation (MR) (Barricelli 1960; R. Epstein, personal communication) and crossreactivation (CR) (Doermann, personal communication) are highly variable depending on the UV-lamp used as a source of radiation. Furthermore this method implicitly relies on the very questionable assumption that the proportion of functional non-genetic damages would be the same for HNO_2 inactivation as for UV.

Inactivation of the *rIIA* and *rIIB* functions

A measure of the survival of Benzer's rA^+ and rB^+ functions after HNO_2-inactivation has been made by Harm (1960) using Krieg's (1959) method. The result showed that the *rIIA*-cistron was inactivated by approximately 23% of the hits (or by a fraction $A = 0.23$ of the total number of hits), while the *rIIB* cistron was inactivated by 18% of the phage lethal hits ($B = 0.18$ of the total number). The corresponding figures for UV-inactivation are, according to Krieg, 10% for the A cistron and 5% for the B cistron.

The target lengths of the *rIIA* and *rIIB* cistrons do not have to be the same for HNO_2 hits as for UV. Nevertheless the above results suggest the following tentative interpretation by the injection damage theory (if a and b designate the target lengths of the *rIIA* and *rIIB* cistrons respectively and if the mean length of UV damages is disregarded):

$$\begin{aligned} &J = 0.13 \text{ of } HNO_2 \text{ damages} \\ &a = 0.10; \quad b = 0.05 \\ &A = J + a = 0.23; \quad B = J + b = 0.18 \end{aligned} \tag{1}$$

The alternative interpretation by the finite damage theory is:

$$L_{AB} = 0.13; \quad a = 0.10; \quad b = 0.05 \qquad (2)$$
$$A = L_{AB} + a = 0.23; \quad B = L_{AB} + b = 0.18$$

where L_{AB} (local damage size) is the mean length one would have to assign to HNO_2 damages in order to explain their probability to overlap with the *rIIA* and or *rIIB* cistron. These tentative values of J and L_{AB} are subject to an error equal to the variation of the target lengths a and b of the two cistrons when the inactivating agent (for instance UV lamp) is substituted.

Host-Killing Efficiency

In both theories the following additional assumption[1] would permit a simple interpretation of host-killing efficiency: The host-killing ability of the phage is controlled by a gene K. Probably the gene K is to be considered as a genetic segment (possibly a cistron) of a certain size k rather than a marker, since the UV-target presented by the killing ability is approximately 2% of the total (Doermann, Chase and Stahl 1955). This is more than the mean length of genetic damages, which is around 0.3% of the total (Barricelli and Doermann 1961) and may suggest a UV target length $k = 0.017$ TU for the K segment.

A genetic damage on the target K, or an injection damage, would cause the bacteriophage to lose its host-killing ability. If L_K is the "local damage size" the survival S_K of the host killing ability will be given, as a function of HNO_2 dose, by formula:

$$S_K = e^{-(L_K + k)\,h} \qquad (3)$$

An analogous formula for S_K can obviously be derived on the basis of the injection damage theory.

$$S_K = e^{-(J+k)h} \qquad (4)$$

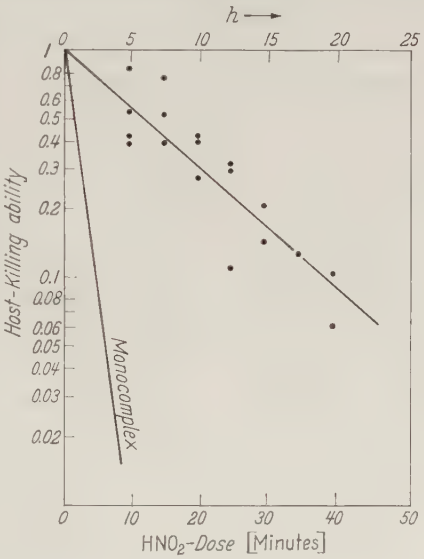


Fig. 1. Persistency of host-killing ability by phage T4 as a function of HNO_2 dose (measured by the number h of phage lethal hits — upper scale — or minutes of exposure — lower scale). — Monocomplex survival. ——— Theoretic persistency of host-killing ability (for $J + k = 0.124$ or $L_K + k = 0.124$) in case a single gene or a short genetic segment is the genetic site of the host-killing ability

In Fig. 1 Harm's (1960) data for host killing ability survival are fitted by the least square method using formula (3) or (4). Obtained parameter values are: $L_K + k = 0.124$ or $J + k = 0.124$. This result suggests a value $L_K = 0.107$ for

[1] This interpretation of host-killing efficiency is probably an oversimplification. There is evidence that even when its genetic material is removed by osmotic shock, the phage (ghost) may still in 40% to 50% of the cases be able to kill the bacterium (Herriott and Barlow 1957). If the HNO_2-action eliminates this "non-genetic" killing ability more efficiently than the genetic (K-gene related—see text) killing ability, no substantial modification would have to be made on the calculations presented in this section. If this is not the case, however, the value of J or L_K obtained in this section would be underestimated, and the correct value would be larger.

the local damage size or a fraction of injection damages $J = 0.107$ if the K segment is supposed to have the same target length $k = 0.017$ for HNO_2 as for UV.

Also this estimate of J and L_K is preliminary. The analysis of MR data in the following section will give much more reliable and accurate values for the mean length of the damages in case the finite damage theory is applied. No good estimate of J seems possible by the present data.

Multiplicity Reactivation (MR) after HNO_2-Inactivation

A comparison between MR data for HNO_2 and UV will *not* be used here as a method to test the injection damage theory for the reasons already indicated

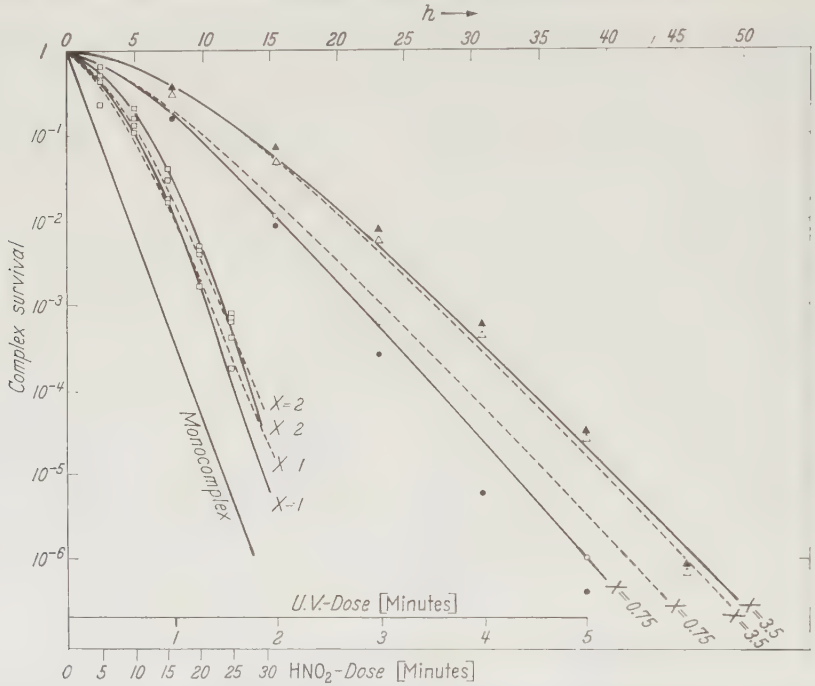


Fig. 2. Fit of multiplicity reactivation data for HNO_2-inactivated (HARM 1960) and for UV inactivated (HARM 1956) phage T4 by the "injection damage theory" (— — —) and by the "finite damage theory" or "chromosomic recombination theory" (————). *Abscissa:* Dose in phage lethal hits (h) and in minutes of UV or HNO_2 treatment. *Ordinate:* Complex-survival. □ Survival of multicomplexes (several multiplicities between 1 and 2) after HNO_2 treatment. ▲ Survival in normal UV treated cultures: geometric mean of two experiments with average multiplicities of 3.5 and 4. △ Survival in snakefree (see HARM 1956) UV treated cultures: geometric mean of two experiments with average multiplicities of 3.35 and 3.5. ● Survival in normal UV treated culture: average multiplicity 0.75. ○ Survival in snakefree (see HARM 1956) UV treated cultures: geometric mean of three experiments with average multiplicities of 0.67, 0.8 and 0.84. The parameter values used to fit the data: *Chromosomic recombination (or finite damage) theory* (————): $L = 0.12$; $\lambda = 0$ (no vulnerable centers) for HNO_2 data and $L = 0.0045$; $\lambda = 0.385$; and 3 vulnerable centers for UV data (instead of $L = 0.004$; $\lambda = 0.39$; and 3 vulnerable centers which was found by the old approximate formula, BARRICELLI 1960). *Injection damage theory* (— — — —): $J = 0.12$; $\lambda = 0{,}65$; and 3 vulnerable centers for HNO_2 data, and $J = 0.0045$; $\lambda = 0.385$; and 3 vulnerable centers for UV data. The J value for UV data is entirely arbitrary since the fit would be equally bad and the curves would remain almost identical by putting $J = 0$ and $\lambda = 0.395$ or $J = 0.003$ and $\lambda = 0.39$ (larger J-values would be inconsistent with CR results, see BARRICELLI and DOERMANN 1961). The figure shows how the injection damage interpretation (— — — —) is ruled out for the case of UV inactivated phage by its inability to fit the data (distance between the two curves too small and almost insensitive to variations of the fraction J of injection damages). For the HNO_2 inactivated phage the figure gives no possibility of deciding between the two theories because the large scattering of the data makes it impossible to determine how large the distance between the two curves should be

in the CR section. However the results which will be presented are not inconsistent with those obtained on the basis of such comparison by HARM, when the uncertainities in the evaluation of J are taken into account.

In Fig. 2 HARM's (1960) MR data for HNO_2 inactivated phage are fitted with two sets of theoretic curves: (1) one set of solid curves (multiplicity $x = 1$ and multiplicity $x = 2$) derived from the finite damage theory; (2) one set of dotted curves (same multiplicities) derived from the injection damage theory.

Finite Damage Theory

Vulnerable centers can be disregarded ($\lambda = 0$, $\lambda_0 = 1$) when the target size of the vulnerable centers is in the same order of magnitude as the target length of the damages outside vulnerable centers. The meaning of vulnerable centers not much larger than the damages would be doubtful and the fit of the data obtained by introducing such vulnerable centers would not be significantly better. The formula to be used for the survival W_m of a complex with multiplicity m is therefore the following, which is valid for damages of any size (BARRICELLI 1961):

$$\ln W_m = \ln \left[1-(1-e^{-Lh})^m\right] - \frac{m(1-L)(1-e^{-Lh})^{m-1} h e^{-Lh}}{1-(1-e^{-Lh})^m} \tag{5}$$

L - Mean length of damages (both genetic, functional, and mixed damages including damages in the vulnerable centers).

In the above formula it is assumed that the phage-genome contains only one linkage structure (see BARRICELLI 1961). From the above formula the survival $\frac{W(x,h)}{M(x)}$ among multicomplexes with average multiplicity x is calculated as usual by formula:

$$\frac{W(x,h)}{M(x)} = \frac{\sum_{m=2}^{\infty} \frac{e^{-x}}{m} x^m W_m}{1-(1+x)e^{-x}} \tag{6}$$

The value of L which fitted the data best, and which is used in Fig. 2 is:

$$L = 0.120 \pm 0.003$$

The expected error indicated is the lowest variation of L which would make the graphic fit to the data visibly worse.

The above L value is consistent with the L_{AB} and the L_K values tentatively proposed previously.

Injection Damage Theory

Assuming $L = 0$ and a large proportion J of injection damages, the formula for W_m becomes (BARRICELLI 1956):

$$\ln W_m = \sum_{i=1}^{r} \ln \left[1-(1-e^{-\lambda_i h})^m\right] \tag{7}$$

and in formula (6) the average multiplicity x will be dose-dependent and decrease by increasing dose at a rate determine by J:

$$x = x_0 e^{-Jh} \tag{8}$$

x_0 being the average multiplicity at dose 0.

By formulas (7) and (8) assuming three vulnerable centers ($r = 3$) the dotted curves in Fig. 2 were obtained using the following values of J and λ:

$$J = 0.12; \quad \lambda = 0.65$$

However even a drastic modification of J would give approximately the same fit and almost the same curves if λ is modified at the same time in the manner required for optimal fitting. For example the following values of J and λ would give approximately the same curves.

$$J = 0.1667; \quad \lambda = 0.55$$

No reliable determination of J seems therefore possible with present data.

Conclusion

Obviously the present data on the effects of HNO_2-inactivation in T4 cannot decide between the injection damage theory and the finite damage theory. The finite damage theory predicts a considerably larger distance between the MR curves for the two average multiplicities $x = 1$ and $x = 2$ (solid curves in Fig. 2) than the injection damage theory (dotted curves in Fig. 2). However as pointed out by Harm (personal communication) the scattering in the HNO_2 data of Fig. 2, in which several multiplicities between 1 and 2 where used, is too large to permit a decision on this ground. More accurate MR experiments with HNO_2 treated phages, expressly devised for this purpose, is one posible way to obtain a decision between the two theories. Another possible way suggested by Doermann (personal communication) would be a CR experiment with two unlinked markers. The probability that both markers should escape many large damages scattered over the whole genome is obviously much smaller than the probability that both markers should escape an injection damage; and both probabilities can be calculated.

Whatever the decision may be concerning the injection damage theory for HNO_2-inactivation, it is already clear that injection damages have not been found in a detectable amount in UV data. Accurate MR experiments by Dulbecco (1952), Harm (1956) and Epstein (1958) are available, which at various doses clearly show the distances between curves of different multiplicities. *In all these cases the theory that UV damages have a finite length (the chromosomic recombination theory,* Barricelli, *1956)* is *in agreement with the data, while the injection damage theory would consistently predict too small a distance between the curves* (Fig. 2).

It is understandable on the basis of one of the simplest chemical interpretations that one would tend to explain each damage in the genetic material caused by radiation or by chemicals as a modification of a single nucleotide or a chemical bond. But whatever the origin of a damage, the extension of the genetic segment unable to reproduce (genetic damage) or unable to perform some biological function (functional damage) can only be measured by genetic methods or methods based on genetic recombination (MR). Previous measures of UV-damages (Barricelli 1956 and 1960. Barricelli and Doermann 1961) have yielded lengths of genetic and or functional UV damages around 0.3% to 0.4% of the genome. These lengths of damage are equivalent to many hundred nucleotides.

What the size of a genetic damage caused by HNO_2 would be is not easy to predict on the basis of chemical arguments. It would seem that only new experiments, such as the two experimental procedures already suggested, can ultimately decide whether "large damages" or "injection damages" or both are produced during HNO_2-inactivation of phage T4.

Summary

The interpretation of experiments with HNO_2-inactivated phage T4 published by HARM (1960) and of similar experiments with UV inactivated phages T2 and T4 (DULBECCO 1952, HARM 1956, and EPSTEIN 1958) is discussed. Two alternative theories are used as possible interpretations of the HNO_2 experiments: (1) The "injection damage" theory holding that a fraction J of the damages caused in a phage by HNO_2 treatment prevent participation of the phage in the infectious process. (2) The "finite damage" theory holding that the damages produced by HNO_2 in the genetic material are much larger (have a greater target length) than UV damages, and otherways applying to HNO_2 damages the same theory earlier applied to UV-damages (BARRICELLI 1956 and 1960).

Experimental methods to decide between the two theories are indicated. In the conclusion it is shown that the injection damage theory is not valid for UV damages in T2 and T4. In this case the theory is ruled out by the results of DULBECCO's (1952), HARM's (1956) and EPSTEIN's (1958) MR experiments.

Acknowledgment. The authors wish to express their gratitude to W. HARM for valuable information in connection with problems treated in this paper.

References

BARRICELLI, N. A.: A "chromosomic" recombination theory for multiplicity-reactivation in phages. Acta biotheor. (Leiden) **11**, 107—120 (1956).

— An analytical approach to the problems of phage recombination and reproduction. I. Multiplicity reactivation and the nature of radiation damages. Virology **2**, 99—135 (1960).

— A general survival law for virus and cells with damaged genetic material. (Virology 1961 in press.)

—, and A. H. DOERMANN: An analytical approach to the problems of phage recombination and reproduction. III. Crossreactivation. Virology **13**, 460—476 (1961).

DOERMANN, A. H., M. CHASE and F. W. STAHL: Genetic recombination and replication in bacteriophage. J. cell. comp. Physiol. **45**, Suppl. **2**, 51—74 (1955).

EPSTEIN, R. H.: A study of multiplicity-reactivation in the bacteriophage T4. Virology **6**, 382—404 (1958).

HARM, W.: On the mechanism of multiplicity-reactivation in bacteriophage. Virology **2**, 559—564 (1956).

— Vergleichende Untersuchungen an HNO_2-inaktivierten und UV-inaktivierten Bakteriophagen T 4. Z. Vererb.-Lehre **91**, 52—62 (1960).

HERRIOTT, R. M., and J. L. BARLOW: The Protein Coats or "Ghosts" of Coli Phage T2. J. gen. Physiol. **41**, 307—331 (1957).

KRIEG, D. R.: A study of gene action in ultraviolet-irradiated bacteriophage T4. Virology 8, 80—98 (1959).

LURIA, S. E.: Reactivation of irradiated bacteriophage by transfer of self-reproducing units. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **33**, 253—264 (1947).

Dr. NILS AALL BARRICELLI and KIRK AVENT,
Division of Molecular Biology, Vanderbilt University,
Nashville, Tennessee (U.S.A.)

Zeitschrift für Vererbungslehre 92, 190—196 (1961)

Botanical Institute, Faculty of Science, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

CYTOGENETIC STUDIES ON THE F_1 HYBRID OF *CHRYSANTHEMUM LINEARE* × *CH. NIPPONICUM*

By

Ryuso Tanaka and Naomasa Shimotomai

With 14 Figures in the Text

(Received April 27, 1961)

Chrysanthemum lineare is a species native to Manchuria, Korea and Japan, while *Ch. nipponicum* is endemic to northern Pacific coasts of Japan. According to Kitamura (1940) they fall into different subsections of the section *Pyrethrum*. Although the two species have the same chromosome number $2n = 18$, they differ greatly from each other in the morphology of chromosomes. According to Shimotomai and Takemoto (1936, 1939) all of the chromosomes of *Ch. lineare* have the centromere in median or submedian position, while two pairs of the chromosomes of *Ch. nipponicum* possess the centromere in subterminal position. Recently, the present authors (in press) reported that *Ch. lineare* has three pairs of satellite chromosomes, while *Ch. nipponicum* only a pair. They also reported that the chromosomes of *Ch. lineare* were about twice as long as those of *Ch. nipponicum*. In the present investigation cytogenetic observations on the F_1 hybrid of the two species were made.

Materials and Methods

Clones of *Chrysanthemum lineare* were collected from Yatsugi in the province of Bingo, and clones of *Ch. nipponicum* were collected from Tanesashi in the province of Mutsu, Japan.

Somatic chromosomes were studied from root tip preparations pretreated with 8-oxyquinoline and stained with aceto-orcein. Meiosis was observed in PMCs squashed in aceto-orcein or aceto-carmine. This method was described in a previous report (Tanaka 1959).

Results

Reciprocal crosses between *Chrysanthemum lineare* and *Ch. nipponicum* were successful. From approximately 1,000 cross pollinations 182 achenes were obtained. Germination of achenes was very poor. Only 24 of the 182 achenes germinated. Most of the seedlings died at an early stage of development. Only three F_1 hybrids survived and flowered in late September.

The morphological characteristics of the F_1 hybrids were more or less intermediate to those of the parental species. The ray flowers were long and narrow. Leaves were narrowly cuneiform with 4—6 marginal teeth, while those of *Ch. lineare* were linear with 2—4 acute marginal teeth and those of *Ch. nipponicum* were broadly cuneiform with 16—20 marginal teeth (Fig. 1). Stems were about 50 cm long and branched. No rhizome was observed in all of the F_1 hybrids, whereas *Ch. lineare* had 3—5 rhizomes. All of the F_1 hybrids obtained were sterile.

1. Somatic chromosomes in F_1 hybrids
(Figs. 2 and 4)

The F_1 hybrids had $2n = 18$ chromosomes. Chromosomes of the parental species were distinguishable through morphological differences. Chromosomes of *Ch. lineare* were about twice as long as those of *Ch. nipponicum*. Even the shortest chromosome of *Ch. lineare*, 9_l, was about one and a half times longer than the longest chromosome of *Ch. nipponicum*, 1_n. Satellites of the three chromosomes of *Ch. lineare*, 4_l, 7_l and 8_l, and that of a chromosome of *Ch. nipponicum*, 8_n, were found without any amphiplastic alteration, while the centromere of chromosome 7_l of *Ch. lineare* was observed being changed into submedian position, and the chromosome 8_n of *Ch. nipponicum* possessed a tandem satellite.

a b c

Fig. 1 a—c. Leaves of *Chrysanthemum nipponicum* (a), *Ch. lineare* (c) and their F_1 hybrid (b). × 1/2

The morphology of the nine chromosomes of *Ch. lineare* was as follows. Chromosome 1_l: This is the longest chromsome and has a median centromere. Chromosome 2_l: This is the second longest chromosome and has a submedian centromere. Proximal regions of the long arm have two small constrictions which are considered to be the loosening of chromonemata spirals. Chromosome 3_l: This is the third longest chromosome and has a submedian centromere. Chromosome 4_l: This is the longest of the satellite chromosomes and has a submedian centromere. Chromosome 5_l: This is one of the medium sized chromosomes and has a median centromere. Chromosome 6_l: This is one of the medium sized chromosomes and has a median centromere. Chromosome 7_l: This is a medium sized chromosome. While in the root tip cells of *Ch. lineare* this chromosome had a centromere in a median position, this was found to have a submedian centromere. The satellite of this chromosome is found on the long arm. Chromosome 8_l: This is the shortest of the satellite chromosomes and has a submedian centromere. Chromosome 9_l: This is the shortest chromosome and has a median centromere.

The morphology of the nine chromosomes of *Ch. nipponicum* was as follows. Chromosome 1_n: This is the longest chromosome with a submedian centromere. Chromosome 2_n: This is the second longest chromosome and has a submedian centromere. Chromosome 3_n: This is the third longest chromosome and has a submedian centromere. Chromosome 4_n: This is one of the medium sized chromosomes and has a submedian centromere. Chromosome 5_n: This is one of the medium sized chromosomes and has a submedian centromere. Chromosome 6_n: This is one of the shorter chromosomes and has a submedian centromere. Chromosome 7_n: This is one of the shorter chromosomes and has a subterminal centromere. Chromosome 8_n: A tandem satellite was observed on the short arm of this

chromosome, while in the root tip cells of *Ch. nipponicum* this chromosome possessed a normal satellite. This is one of the shorter chromosomes and has subterminal centromere. Chromosome 9_n: This is the shortest chromosome and has a submedian centromere.

Fig. 2

Fig. 3

Figs. 2 and 3. Somatic and meiotic chromosomes of the F_1 hybrids of *Chrysanthemum lineare* × *Ch. nipponicum*. Parental chromosomes can be distinguished by the difference in length and by the position of centromeres. The chromosomes of *Ch. lineare* were designated by letter *l* and those of *Ch. nipponicum* by letter *n*. Fig. 2: Somatic chromosomes of the F_1 hybrid (Text-figure 4). Fig. 3: Meiotic chromosomes in a PMC at early diakinesis of the F_1 hybrid. $3_{II} + 12_I$. The three bivalents were 1_l—1_n, 2_l—2_n and 3_l—3_n. Four univalents, 4_l, 7_l, 8_l and 8_n, were found to have satellites and attached to nucleoli (Text-figure 5). ×2700

2. *Meiotic chromosomes in* F_1 *hybrids*

(Figs. 3, 5, 6—14; Table)

Meiosis in the three F_1 hybrids obtained showed similar chromosome behaviour. Meiosis was irregular with poor pairing of chromosomes. At metaphase I six

types of chromosome configurations were found: $5_{II}+8_I$, $4_{II}+10_I$, $3_{II}+12_I$, $2_{II}+14_I$, $1_{II}+16_I$ and 18_I (Table). The commonest configuration was $3_{II}+12_I$.

Parental chromosomes in PMCs at meiosis were distinguished by the difference in length and by the position of centromeres (Fig. 3). Chromosomes of *Ch. lineare* were about twice as long as the chromosomes of *Ch. nipponicum*.

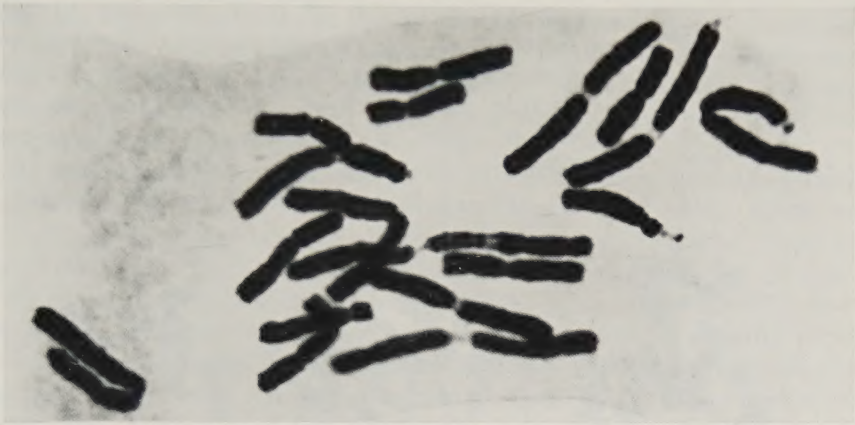


Fig. 4

Fig. 5

Figs. 4 and 5. Photomicrographs of somatic and meiotic chromosomes of the F_1 hybrid of *Chrysanthemum lineare* × *Ch. nipponicum*. Fig. 4: Somatic chromosomes of the F_1 hybrid. Fig. 5: Meiotic chromosomes in a PMC at early diakinesis of the F_1 hybrid. $3_{II}+12_I$. ×2400

At diakinesis four univalent chromosomes, 4_l, 7_l, 8_l and 8_n, were found attached to nucleoli at the arms possessing the satellites. The satellites were also attached to the nucleoli. In some PMCs one of the satellite chromosomes, 7_l, was not attached to the nucleolus. In these cases the satellite of the chromosome was also not attached to the nucleolus.

In most PMCs at diakinesis 3 bivalents and 12 univalents were observed. The three bivalents were the longer chromosomes of the parental species and had median or submedian centromeres. The three bivalents were identified as chromosomes 1_l—1_n, 2_l—2_n and 3_l—3_n.

Table. *Frequencies of chromosome configurations at metaphase I in the PMCs of the F_1 hybrids of Chrysanthemum lineare × Ch. nipponicum*

Configurations	Number of PMC
$5_{II} + 8_I$	5
$4_{II} + 10_I$	7
$3_{II} + 12_I$	46
$2_{II} + 14_I$	21
$1_{II} + 16_I$	28
18_I	10

Homologous chromosomes of the bivalents were unequal. In most PMCs observed the bivalents showed matrix connection (Figs. 3 and 9). Conjugation of 1_l—1_n was found to be a matrix connection at the subterminal regions of the long arms of chromosomes. Conjugation of 2_l—2_n was also a matrix connection at the terminal regions of the long arms of chromosomes. In contrast to these two bivalents, the third bivalent, 3_l—3_n, formed a chiasma at the median region of the long arms of chromosomes. Therefore, the three pairs of chromosomes $1_l\,1_n$, $2_l\,2_n$ and $3_l\,3_n$ can be considered partially homologous.

Figs. 6—14. Meiotic chromosomes in the PMCs of the F_1 hybrid of *Chrysanthemum lineare* × *Ch. nipponicum*. The longer nine chromosomes are the chromosomes of *Ch. lineare*. The shorter nine chromosomes are the chromosomes of *Ch. nipponicum*. Fig. 6: Chromosomes at diakinesis. $3_{II} + 12_I$. Three univalents attached to a nuleolus. Fig. 7: Chromosomes at diakinesis. $3_{II} + 12_I$. Four univalents attached to nucleoli. Fig. 8: Chromosomes at metaphase I. $3_{II} + 12_I$. Fig. 9: Chromosomes at metaphase I. $5_{II} + 8_I$. Fig. 10: Chromosomes at early anaphase I. Fig. 11: Chromosomes at late anaphase I, showing a chromosome bridge. Fig. 12: Chromosomes at telophase I, showing two large lagging chromosomes separated longitudinally. Fig. 13: Chromosomes at anaphase II, showing an unequal distribution of the chromosomes of *Ch. lineare*. Fig. 14: A tetrad with three micronuclei. ×750

At early anaphase I some univalents moved toward the poles ahead of the chromosomes of bivalents, while others remained on the equatorial plate. The distribution of chromosomes to poles varied in number from 0 to 18. Most PMCs at telophase I had 9 or 10 chromosomes at a pole. In a few PMCs a chromosome bridge was observed (Fig. 11). The chromosome bridge was formed by the matrix connecting chromosomes of *Ch. lineare* and *Ch. nipponicum*.

Most PMCs formed lagging chromosomes at telophase I. These lagging chromosomes were the longer chromosomes of the complement and already divided longitudinally (Fig. 12). The lagging chromosomes were identified as the chromosome of *Ch. lineare*.

At metaphase II, chromosomes varied in number from 1 to 18 at the two equatorial plates. Few PMCs had 9 chromosomes per plate. Some PMCs (about 10% of observed PMCs) had only one plate having 18 chromosomes. These PMCs might have been originated from the restitution of nucleus at first meiotic division.

At anaphase II chromosomes in most PMCs separated to the poles to form four nuclei. The distribution of chromosomes was irregular showing variation in chromosome number. The longer chromosomes were irregularly distributed (Fig. 13). These were probably the chromosomes of *Ch. lineare* which were separated longitudinally at late anaphase I.

At telophase II several types of microspore groups were observed. They were the dyad, dyad with 1—3 microcytes, triad, triad with 1—3 microcytes, tetrad, and tetrad with 1—3 microcytes. All of these sporads contained several round particles which were stainable with aceto-orcein and aceto-carmine. Similar round particles were observed at late anaphase I. Origin of these remains undetermined.

Pollen grains varied in size from about 40 μ to about 10 μ in diameter. Most pollen grains observed were without cytoplasmic and nucleic components. However, few pollen grains had cytoplasm and a nucleus. These were the giant cells.

Discussion

In both root tips and PMCs of F_1 hybrids the chromosomes of parental species showed differences in morphological characteristics as well as partial homology. Since the highest number of bivalents observed in F_1 hybrids was 5, it can be concluded that there are five pairs of partially homologous chromosomes. Thus, the genomes of the two species, *Ch. lineare* and *Ch. nipponicum*, are partially homologous.

Tobgy (1943) observed in the hybrid of *Crepis fuliginosa* × *C. neglecta* that although the parental chromosomes at metaphase I showed great differences in length they exhibited good pairing. The reason for the successful association was that at prophase the parental chromosomes showed no differences in length, and thereby permitted regular pairing of chromosomes. Similar observations were made in *Gossypium* hybrids by Brown (1958). With the present material the parental chromosomes differed in length at both prophase and mataphase I of meiosis, thereby resulting in the poor pairing.

Summary

1. A cytogenetic study on an inter-subsectional F_1 hybrid of *Chrysanthemum lineare* ($2n = 18$) × *Ch. nipponicum* ($2n = 18$) was reported.

2. Although chromosomes of *Ch. lineare* were about two times longer than those of *Ch. nipponicum*, chromosomes at meiotic division in the PMCs of F_1 hybrids formed bivalents and univalents.

3. Six types of chromosome configurations were observed: $5_{II}+8_I$, $4_{II}+10_I$, $3_{II}+12_I$, $2_{II}+14_I$, $1_{II}+16_I$ and 18_I. The commonest configuration was $3_{II}+12_I$.

4. All of the bivalents were of unequal form and most were matrix connections.

5. Bivalents were the longer chromosomes of the parental species. Therefore, the longer chromosomes of *Ch. lineare* were partially homologous to the longer chromosomes of *Ch. nipponicum*, while the shorter ones and satellite chromosomes were completely nonhomologous to the corresponding chromosomes of *Ch. nipponicum*.

Literature

Brown, M. S.: The implications of pachytene and metaphase pairing for species differentiation. Proceeding X. Inter. Congr. Gen., 1958, Vol. II.

Kitamura, S.: Compositae Japonicae. Pars. Secunda. Mem. Coll. Sci., Kyoto Imp. Univ., Ser. B **15** (3), Art. 9, 285—446 (1940).

Shimotomai, N., u. T. Takemoto: Über die Morphologie der Chromosomen bei 6 Arten von *Chrysanthemum*. [Japanese with German résumé.] Bot. Mag. **50**, 324—331 (1936).

— — Über die Morphologie der Chromosomen bei 6 Arten von *Chrysanthemum*. [German.] J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B Div. 2, **3**, Art. 13, 201—204 (1939).

Tanaka, R., and N. Shimotomai: On the speciation and karyotypes in diploid and tetraploid species of *Chrysanthemum*. I. Karyotypes in *Chrysanthemum boreale* ($2n=18$). J. Sci. Hiroshima Univ. Series B., Div. 2, **9**, 1—16 (1959).

— — Karyotypes in four diploid species of *Chrysanthemum*. Cytologia. (In the press.)

Tobgy, H. A.: A cytological study of *Crepis fuliginosa*, *C. neglecta*, and their F_1 hybrid, and its bearing on mechanism of phylogenetic reduction in chromosome number. J. Genet. **45**, 67—111 (1943).

Dr. Ryuso Tanaka,
Botanical Institute, Faculty of Science, Hiroshima University,
Hiroshima, Japan